

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**

**STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Průnik nanočástic sublingvální membránou 4**

**Permeation of Nanoparticles Across Sublingual Membrane 4**

**Lenka Horejšová**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové 2014

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, kterým je doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc., za odborné vedení. Velký dík patří také konzultantovi Mgr. Pavlovi Berkovi za vedení experimentální části mé diplomové práce, za jeho ochotu poradit a za pomoc při zpracování výsledků.

Poděkování patří také mé kolegyni Michaelle Šašurové, která se mnou tvořila v laboratoři pracovní tandem.

## Obsah

<b>1</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ZADÁNÍ PRÁCE.....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>5.1</b>	<b>Stavba a funkce dutiny ústní.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Skladba dutiny ústní a její vlastnosti .....</b>	<b>11</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Lidský jazyk.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Slinné žlázy a sliny.....</b>	<b>12</b>
<b>5.2</b>	<b>Podávání léčiv do dutiny ústní .....</b>	<b>13</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Sublingvální podání.....</b>	<b>13</b>
<b>5.3</b>	<b>Nanočástice.....</b>	<b>14</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Nanotechnologie.....</b>	<b>14</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Vlastnosti nanočástic .....</b>	<b>15</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Nanočástice pro lékové formy .....</b>	<b>16</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Nanomedicína .....</b>	<b>17</b>
	<b>5.3.5 Vlastnosti nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeonem.....</b>	<b>18</b>
<b>5.4</b>	<b>Použité metody měření.....</b>	<b>18</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Fluorescenční mikroskop.....</b>	<b>18</b>
<b>5.4.2</b>	<b>DLS - měření distribuce částic .....</b>	<b>20</b>

<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
6.1	Použité suroviny.....	22
6.2	Použité přístroje.....	24
6.3	Použité metody .....	25
6.3.1	Biologický materiál.....	25
6.3.2	Složení a příprava pufrů.....	26
6.3.3	Stanovení hodnoty pH vzorků disperzí nanočástic.....	28
6.3.4	Měření velikosti nanočástic v disperzi .....	29
6.3.5	Desintegrace shluků .....	31
6.3.6	Uskutečnění permeačních pokusů .....	32
6.3.7	Příprava kalibračních vzorků .....	34
6.3.8	Měření koncentrací v kalibračních a permeačních vzorcích .....	36
6.3.9	Fluorescenční mikroskopie.....	36
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>37</b>
7.1	Hodnoty pH disperzí nanočástic .....	37
7.2	Zastoupení velikosti částic v disperzích měřené metodou DLS.....	38
7.3	Sledování shluků nanočástic ve vzorcích fluorescenčním mikroskopem.....	53
7.4	Kalibrační přímky .....	56
7.5	Vyhodnocení permeačních pokusů .....	57

<b>7.5.1 Srovnání vlivu donorových fází na přechod nanočástic přes sublingvální membránu .....</b>	<b>58</b>
<b>7.5.1.1 Permeační pokus P1 .....</b>	<b>59</b>
<b>7.5.1.2 Permeační pokus P2 .....</b>	<b>61</b>
<b>7.6 Fotodokumentace z fluorescenční mikroskopie .....</b>	<b>66</b>
<b>8 ZÁVĚRY .....</b>	<b>71</b>
<b>9 POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>76</b>
<b>11 PŘÍLOHY.....</b>	<b>78</b>

# 1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické technologie

Školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Posluchač: Lenka Horejšová

Název diplomové práce: Průnik nanočástic sublingvální membránou 4

V teoretické části je popsána anatomie a fyziologie dutiny ústní, sublingvální podání léčiv, teorie nanotechnologie a popis vlastností nanočástic se zaměřením se na nanočásticové lékové formy a jsou zde popsány metody a přístrojové vybavení pro experiment.

Experimentální část popisuje *in vitro* permeační pokusy nanočástic PD značených Chromeonem 470 přes prasečí sublingvální membránu o ploše 1 cm<sup>2</sup>. Práce porovnává přestup nanočástic z fosfátového pufru o pH 6,6 a z citrátového pufru o pH 6,6 do akceptorové fáze, kterou tvoří fosfátový pufr o pH 7,4. První permeační pokus pracuje s dlouhodobě zmrazenou sublingvální membránou, druhý pokus s membránou čerstvě vypreparovanou. Před zahájením permeací byly změřeny rozměry nanočástic a agregátů částic v disperzích, metodou dynamického rozptylu světla.

Tato práce dokazuje, že volba donorového média na průnik nanočástic sublingvální membránou nemá podstatný vliv.

**Klíčová slova:** nanočástice, fluorescenční mikroskopie, sublingvální permeace, Chromeon 470, DLS (dynamický rozptyl světla)

## 2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Consultant: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Student: Lenka Horejšová

Title of Thesis: Permeation of Nanoparticles Across Sublingual Membrane 4

The theoretical part describes the anatomy and physiology of oral cavity and sublingual drug administration. It also describes theory of nanotechnology and the characterization of nanoparticles with a focus on nanoparticle drug forms and there are also mentioned methods and measuring device.

.

The experimental part describes in vitro permeation experiment of nanoparticles (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated). Permeation of this nanoparticles through porcine sublingual membrane (1 cm<sup>2</sup>). Thesis compares nanoparticles transfer of phosphate buffer pH 6.6 and citrate buffer pH 6.6 to the acceptor phase consisting of phosphate buffer pH 7.4. First permeation experiment works with frozen sublingual membrane, a second experiment with the native membrane. The dimension of nanoparticles and aggregates of nanoparticles in dispersions were measured before the start of permeation by the dynamic light scattering.

This work demonstrates that the choice of donor buffer has not an important influence.

**Key words:** nanoparticles, fluorescent microscopy, sublingual permeation, Chromeon 470, DLS (dynamic light scattering)



### 3 Zadání práce

1. Zpracování překladu relevantních statí dle zadání školitele
2. Vyhledání informací v databázích a zpracování rešerše
3. Obecná formulace cíle práce
4. Realizace a vyhodnocení prvního bloku pokusů
5. Upřesnění cíle práce
6. Provedení druhého bloku pokusů
7. Vypracování prvopisu práce s předběžnou formulací závěrů a jejich konzultace
8. Vyhotovení konečné podoby práce
9. Příprava referátu k obhajobě a stanoviska k posudkům diplomové práce

V teoretické části je úkolem nastínit problematiku nanočástic, anatomie a fyziologie dutiny ústní a jazyka, sublingvální podání léčiv a popis použitých měřících přístrojů.

Cíle experimentální části této práce jsou:

1. Určení hodnot pH disperzí nanočástic značených fluorescenčním barvivem
2. Stanovení velikosti částic a jejich aglomerátů obsažených v disperzích vzorků nanočástic metodou DLS
3. Prozkoumat agregáty v disperzích nanočástic za použití fluorescenčního mikroskopu
4. Kvantitativní vyhodnocení experimentálních permeačních pokusů s nanočásticemi a kofeinem
5. Stanovení vlivu zmrazených a nativních prasečích sublingválních membrán na permeace nanočástic
6. Stanovení fluoreskujících nanočástic z obou stran membrány fluorescenčním mikroskopem
7. Vyhodnocení vlivu donorové fáze na přechod nanočástic přes membránu

## 4 Úvod

Nanotechnologie je v posledních letech velice rychle se rozvíjející obor zasahující do mnoha odvětví a vědních oblastí. Výjimku netvoří ani medicína a farmacie o čemž hovoří stále častější poptávka po nových, účinnějších léčivých formách. V současné době jsou v praxi hojně používány mikročástice a mikročásticové systémy, které jsou pomalu na ústupu a zvolna je vytlačují nanočásticové léčivé formy, reagující na velký rozvoj farmakologie a toxikologie.

Popularita nanočástic souvisí s jejich dramaticky jinými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Mají větší měrný povrch vzhledem k objemu a v organismu jsou biologicky aktivnější, což může souviset i jejich toxicitou.

V moderní farmacii se nanotechnologie uplatňuje při zapouzdřování léčiv, jako nosiče některých obtížně vstřebatelných látek, k cílené dopravě léků v organismu (např. cytostatika, antibiotika), čímž se zásadně snižuje jejich toxicita atd.

Katedra farmaceutické technologie FaF UK v Hradci Králové se výzkumem vlastností chováním nanočástic zabývá několik posledních let.

Prezentovaná diplomová práce se soustřeďuje na přechod nanočástic značených fluorescenčním barvivem přes prasečí sublingvální membránu v *in vitro* pokusech. Prasečí sublingvální membrána suplovala sublingvální membránu lidskou, protože z hlediska anatomického a fyziologického je jí nejvíce podobná. Fyziologické prostředí lidského organismu bylo napodobeno pomocí fosfátových pufrů o pH 6,6 a o pH 7,4 a pufrem citrátovým o pH 6,6.

## 5 Teoretická část

### 5.1 Stavba a funkce dutiny ústní

#### 5.1.1 Skladba dutiny ústní a její vlastnosti

Dutina ústní je součástí trávicího ústrojí a skládá se z ústní štěrbiny (*rima oris*), která jde až k hltanové úžině (*istmus faucium*) a je ohraničena zevně rty (*labia oris*) a tvářemi (*buccae*). Horní část dutiny ústní tvoří patro (*palatum*), spodinu úst tvoří svalové dno, na jehož prostředku je jazyk (*lingua*), který přechází ve sliznici dutiny ústní. Předsín dutiny ústní (*vestibulum oris*) ohraničují zuby a dásně a navazuje na ní vlastní dutina ústní (*cavitas oris propria*).<sup>1</sup>

Dutina ústní slouží k příjmu a k primárnímu zpracování potravy a přes její sliznici dochází k vstřebávání živin a léků do krve, toho se například využívá při sublingválním podávání léčiv, která se odtud velmi rychle vstřebávají do systémového oběhu.<sup>1</sup>

#### 5.1.2 Lidský jazyk

Jazyk (*lingua*) je svalový orgán pokrytý sliznicí a svými svaly je spojen s dolní čelistí a jazylkou, měkkým patrem, *processus styloideus* a se stěnou hltanu. Jazyk se skládá z kořene jazyka (*radix linguae*), těla jazyka (*corpus linguae*) a hrotu jazyka (*apex linguae*).<sup>1</sup>

Sliznici jazyka tvoří mnohovrstevný dlaždicový epitel, který na hrotu a hřbetu jazyka vytváří papily (*papillae linguales*), jejichž epitel na povrchu rohovatí. Buňky tohoto epitelu jsou pevně spojeny a tvoří malé mezibuněčné prostory. Dlaždicový epitel tvoří několik druhů papil (nitkovité, kuželovité, houbovitě, hrazené a listovité). Ve stěnách hrazených papil se nacházejí chuťové pohárky (*caliculi gustatorii*), jejichž báze jsou opředeny zakončeními vláken nervů, která přijímají chuťové vjemy.

Na kořeni jazyka jsou pod sliznicí lymfatické tkáně, tvořené mízními folikuly (*tonsila lingualis*).<sup>1</sup>

Svaly jazyka tvoří celou hmotu jazyka a dělí se na svaly extraglosální, které jazykem pohybují a interglosální svaly, které jsou uspořádány ve třech navzájem na sebe kolmých směrech a mění tvar jazyka.

Svaly jazyka inervují *nervus hypoglossus* (XII. hlavový nerv) a *nervus glossopharyngeus* (IX. hlavový nerv).<sup>1</sup>

### 5.1.3 Slinné žlázy a sliny

Do dutiny ústní ústí slinné žlázy (*glandulae oris*), jejichž produktem je slina (*saliva*). Tento sekret je buď řídký – serosní nebo hlenovitý – mucinosní. V serosní složce je obsažen enzym štěpící škroby (ptyalin) a hlenovitá složka funguje jako obal soust, dělá je hladšími a snadnějšími pro polknutí.<sup>3</sup>

Stavebně dělíme slinné žlázy na drobné slinné žlázy (*glandulae salivariae minores*) rozvětvené ve slizničním vazivu a velké slinné žlázy (*glandulae salivariae majores*) vysunuté jako větší orgány dále od sliznice a ústíci samotnými velkými vývody. Mezi drobné slinné žlázy patří *glandulae labiales*, *buccales*, *molares*, *palatinae* a *linguales* a jako velké slinné žlázy označujeme *glandula karotis*, *submandibularis* a *sublingualis*.<sup>1</sup>

Sliny jsou tvořeny slinnými žlázami neustále rychlostí cca 0,5 ml/min to odpovídá přibližně 1,5-2,0 litru denně. Sliny z největší části tvoří voda (99,4%), dále organické látky (mucin, imunoglobulin A, enzym lysozym a ptyalin) a látky anorganického původu (převážně  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ ). Tvorbu slin může zvýšit dráždění chuťových a čichových buněk, ale také představy utvořené v mozkové kůře. Tvorba slin závisí především na stavu hydratace organismu. Když má organismus vody málo, tvorba slin stagnuje a hltan i ústa vysychají, což se

projevuje jako žížeň. Žížeň se dá tedy považovat za důležitý faktor k udržování rovnováhy tekutin v organismu.<sup>2,3</sup>

## **5.2 Podávání léčiv do dutiny ústní**

Léčiva vstřebávající se z dutiny ústní mohou být absorbována sublingválně, bukálně a gingivální. Benefitem těchto způsobů podání je vyhnutí se presystémové eliminaci (kyselé prostředí žaludku a enzymů v něm a před vlivem prvního průchodu játry – first-pass effect), rychlý nástup účinku podobný intravenózní aplikaci, malá dráždivost těchto lékových forem a snadná a nebolestivá aplikace, případně pohodlné přerušování dávkování (vyjmutím léku z úst).<sup>4,5,6</sup>

### **5.2.1 Sublingvální podání**

V dutině ústní je pH spíše neutrální (hodnota pH je zde přibližně 6,5; názory autorů se v publikacích vždy trochu liší), proto je možné podávat touto cestou i méně stabilní substance. Tímto podáním přecházejí léčiva skrz dobře prokrvenou sliznici do systémového řečiště. Tato léčiva musí být dostatečně lipofilní s malou molekulovou hmotností, aby se mohla vstřebat přes tenkou sublingvální membránu difuzí do krevního řečiště horní duté žíly a odtud do srdce. Pro tuto cestu podání jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv, jako je povrchové napětí, acidobazické chování, adsorpce léčiva na rozhraní fází a jeho lipo-hydrofilní chování. Podmínkou pro toto podání je dostatečná spolupráce pacienta a hydratace jeho organismu.<sup>4,6</sup>

Jako **sublingvální lékové formy** se uplatňují například lingvety (podjazykové tablety obsahující např. nitroglycerin), spreje (např. glyceroltrinitrát), lízátka (např. fentanyl tlumící silné bolesti) nebo porézní cukrové kostičky (např. analgetikum tramadol, anestetikum ketamin, parasymptomimetikum neostigmin).<sup>6,7</sup>

Mezi **výhody** sublingvální aplikace patří rychlost absorpce a dosažení účinku, která je větší než při perorálním podávání léčiva. Proto se některé formy používají jako pohotovostní při život ohrožujících stavech, např. sublingvální sprej glyceroltrinitrátu při infarktu myokardu (úleva přichází do dvou minut). Jak už je uvedeno výše, vstřebáním přes sublingvální membránu se léčivo dostane přímo do krve a vyhne se tak first-pass efektu a agresivnímu žaludečnímu prostředí, které může léčivo rozložit na neúčinné složky. Nespornou výhodou je i snadné přerušení léčby vyjmutím zbytku tablety po dosažení žádaného účinku nebo po objevení nežádoucích účinků.<sup>8</sup>

Tento způsob podání léčiv má i několik **nevýhod**. Protože se nelze vyhnout polykání slin obsahujících léčivou látku, po čemž dojde k systémovému působení, je nutné pacienta poučit o maximální denní dávce. Tímto také dochází ke ztrátám léčiva labilního na žaludeční prostředí. Během aplikace léčiva pod jazyk by pacient neměl jíst, pít, mluvit ani kouřit. Spolknutím tablety dochází k přerušení absorpce léčiva, proto není vhodné takto podávat léky nespolupracujícím pacientům, jako jsou malé děti nebo někteří senioři. Tato forma aplikace se nehodí pro nepříjemně chutnající a dráždivé látky.<sup>6,8</sup>

## **5.3 Nanočástice**

### **5.3.1 Nanotechnologie**

Nejčastěji používaná definice nanotechnologie se týká struktur, zařízení a systémů, které mají nové vlastnosti a funkce v důsledku uspořádání jejich atomů v měřítku nanometrů. K rozvoji nanotechnologie přispívá mnoho oborů včetně molekulové fyziky, chemie, biologie, informatiky, elektrotechniky a strojírenství.

10,17

Zakladatelem nanotechnologie je nositel Nobelovy ceny, americký fyzik Richard Feynman (11.5.1918 – 15.2.1988), který na kongresu American Physical Society v roce 1959 představil problematiku nanotechnologie svojí přednáškou There's Plenty of Room at the Bottom (přeloženo: Tam dole je spousta místa). Jeho nejznámějšími pokračovateli v rozvoji nanotechnologie byl Kim Eric Drexler a Timothy Leary.<sup>12</sup>

V poslední době zaznamenala nanotechnologie velký rozvoj. Nanotechnologiím je dnes možné věnovat se v různých oborech a použít je v dané technologii. Dá se říci, že se týkají všeho kolem nás. Pojem nanotechnologie vychází z řeckého nanos (trpaslík) a techné (věda).<sup>18</sup>

### **5.3.2 Vlastnosti nanočástic**

Rozhodujícím kritériem je u nanotechnologií velikost částic, která je řádově v nanometrech (tedy  $10^{-9}\text{m}$ ). Ve středu zájmu nanotechnologie jsou tedy nanomateriály a nanočástice o rozměrech mezi 1nm až 100nm, novější zdroje však uvádějí, že nanočástice jsou částice větší než 1nm a menší než 1000nm.<sup>17,33</sup>

Důležitou charakteristikou nanočástic jsou jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Tvar nanočástic je kulovitý, nepravidelný a plocha povrchu je nepoměrně větší k jejich objemu, to má velký vliv na jejich vlastnosti, chování a stabilitu. Stabilita je zde chápána jako udržení si daných vlastností beze změny v čase. Stabilitu nanočástic v disperzích ovlivňuje disperzní prostředí, volba disperzních částic a stupeň disperzity. Stabilitu můžeme dělit na stabilitu agregátní, odolávající procesům snižujícím povrchovou energii na rozhraní disperzní fáze a disperzního prostředí a stabilitu sedimentační, což je odolávání změnám v disperzi vlivem gravitační síly. Pro zvýšení stability se nanočástice musí zesíťovat nebo jinak upravit.<sup>19</sup>

V téhle práci se soustředíme spíše na užití nanobiotechnologie a nanomedicíny, které se uplatňuje u zapouzdřování léků, cílené distribuce léků, u tkáňového inženýrství, biokompatibilních a bioanalogických materiálů a vrstev, v molekulární analýze a v diagnostice. Většina těchto nanočástic je založena na organických polymerech a fosfolipidech.<sup>9</sup>

### 5.3.3 Nanočástice pro lékové formy

Hlavní výhodou částicových lékových forem je z hlediska farmakoterapeutického zmírnění nežádoucích vedlejších účinků a možnost řízeného uvolňování. Nanočástice mohou například sloužit jako nosiče pro běžně špatně se vstřebávající látky, které jsou schopné dopravit léčivo do absorpčně výhodnějších míst nebo přímo do cíle terapeutického působení. Velký potenciál mají nanočástice v bezpečnější farmakoterapii nádorových onemocnění, kdy se léčivo dostává přímo do postižené tkáně a sníží se tak nežádoucí účinky na tkáň zdravou. Značnou nevýhodou nanočástic je jejich toxicita, protože jsou díky své malé velikosti snadno prostupné přes různé bariéry v organismu, projdou dokonce až do buněk nebo skrz hematoencefalickou bariéru.<sup>15</sup>

Nanočástice dělíme na nanosféry připravované polymerizací nebo polykondenzací a nanotobolky, jež jsou vyráběny fyzikálně-chemickými procesy z předpřipravených polymerů. Mezi syntetické materiály, z kterých jsou nejčastěji nanočástice vyráběny patří alifatické polyestery (kys. polyglykolová), polyalkylkyanoakryláty, polyhydroxyalkanoáty a přírodní polymerní nanočástice, jako je želatina, chitosan a jiné polysacharidy. Mezi již používané nanočástice patří například matricové nanočástice, micely a lipozomy, zatímco hůdkou budoucnosti jsou takzvané chytré nanočástice.<sup>15</sup>

Chytré nanočástice mají schopnost reagovat na stimuly nebo specifická prostředí organismu. Tyto mechanismy mohou být fyzikálního charakteru (teplo,



světlo, tlak), fyzikálně-chemického charakteru (solvatace, bobtnání), iontového charakteru (pH, vliv elektrolytů), mohou reagovat na vliv enzymů (hydrolýza) nebo se tyto vlivy mohou kombinovat. Schopnost částicím reagovat na tyto podněty dává jejich struktura, případně funkční skupiny.<sup>15</sup>

Příklady chytrých nanočástic

**Polymerové lipozomy** – fungují jako nosiče transportující ve svém hydrofilním jádře hydrofilní léčiva případně lipofilní léčiva na své membráně. Lipozomy lze modifikovat připojením polymeru makrogolu na jejich povrch (např. polyethylenglykol), čímž se zvýší hydrofilita.

Z farmakoterapeutického hlediska jsou zajímavé lipozomy citlivé na slabě kyselé pH, které jsou v tomto prostředí schopné se rozpadnout a uvolnit obsažené léčivo. Největší potenciál mají jako farmakoterapeutika nádorů, jejichž pH je obecně kyselější.<sup>11,15</sup>

Dalším typem jsou lipozomy citlivé na změnu teploty, vznikající připojením termosenzitivních polymerů, které dokáží změnit konformaci v závislosti na změně teploty, vycházející z vratné hydratace a dehydratace nosných polymerů.<sup>10,14</sup>

**Dentritové polymery (dendrimery)** – mají definovanou jednotnou molekulovou strukturu a je v nich možné uzavřít pomocí nekovalentních vazeb molekuly aktivních látek. Také je možné vyrobit dendrimery citlivé na pH, na teplo, na světlo a na různé chemické a enzymatické změny.<sup>11,15</sup>

#### 5.3.4 Nanomedicína

Největším zájmem medicíny je v této oblasti schopnost specificky cílit na konkrétní orgány, což je možné například prostřednictvím konjugace nanonosiče protilátky nosného léčiva a jeho cílového antigenu, nacházejícího se v specifické nemocné tkáni, kam je směřován. Nejčastěji jako chemoterapie nádorových onemocnění (např. tamoxifen).<sup>13</sup>

Nanoléčiva a nanodiagnostika vede často k vyšší biologické dostupnosti při nižších dávkách, čímž se snižuje míra nežádoucích účinků v klinické praxi a zvyšuje se compliance. Nanočástice se využívají také ve farmakogenomice, kde mohou prostřednictvím interakce léčiv a genů modulovat farmakoterapeutické výsledky, genetickou variabilitou nebo lékově regulovanou genovou expresí.<sup>11,14</sup>

Medicína využívá nanočástic k molekulární analýze a analýze DNA, ale také u tkáňového inženýrství.<sup>9,11</sup>

### **5.3.5 Vlastnosti nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeon**

Jde o nanočástice tvořené nově vyvinutým polymerem PD, vlastnostmi podobné polystyrenu, což se projevuje jeho nižší propustností pro kyslík, což má za následek vyšší fotostabilitu pro většinu barviv. Tyto částice jsou značené fluorescenčním barvivem Chromeon 470. Fluorescenční PD částice jsou vhodné k značení proteinů a k detekci reakce antigenu a protilátky. Uchovávají se v temnu při teplotě 2 – 8°C.<sup>16</sup>

## **5.4 Použité metody měření**

### **5.4.1 Fluorescenční mikroskop**

Fluorescenční mikroskopie zaznamenala velký boom v rozšiřování technologií hlavně biologických a lékařských věd. Tato technika umožňuje identifikovat buňky a buněčné komponenty s vysokou mírou specifčnosti, například některé protilátky, diagnostikovat různé nemoci nebo odhalovat nečistoty.<sup>20</sup>

Pomocí fluorescenční mikroskopie je možné pozorovat objekty, které jsou sami o sobě zdrojem světla, tedy fluoreskují. Fluorescenční mikroskop je založen na principu ozáření zkoumaného materiálu světlem (nejčastějším světelným zdrojem je

rtuťová nebo xenonová výbojka a halogenové žárovky) o specifické vlnové délce, který potom emituje energii detekovatelnou jako viditelné světlo.<sup>21,22</sup>

Základním úkolem fluorescenčního mikroskopu je nechat vzorek vyzařovat excitační světlo a pak vytvořit obraz tříděním mnohem slabšího vyzařovaného světla. Mikroskop má filtr, který umožňuje pouze záření o té vlnové délce, která odpovídá požadavkům sledovaného fluoreskujícího materiálu. Záření se srazí s atomy pozorovaného vzorku a tím dojde k přestupu elektronů do vyšší energetické hladiny. Když se pak zpátky dostanou do nižší energetické hladiny, emitují světlo. V dalším filtru se odděluje emitované světlo od jasnějšího excitačního světla. Toto emitované světlo má nižší energii a delší vlnovou délku. V mikroskopu pozorujeme fluoreskující oblasti zářící na tmavém pozadí s vysokým kontrastem. Aby mohl být vzorek takto detekován, je nutné, aby obsahoval takzvaný fluofoor, tedy látku schopnou po ozáření světlem určité vlnové délky uvolňovat světlo o delší vlnové délce, tedy fluoreskovat.<sup>21,22</sup>

Nevýhodou fluorescenčního mikroskopu je, že jsou excitovány i části vzorku nacházející se v jiných hladinách, což přispívá k rozmazání obrazu.<sup>22</sup>



**Obr. 1** - Fluorescenční mikroskop – Olympus BX51<sup>23</sup>

### 5.4.2 DLS - měření distribuce velikosti částic

Metoda měření pomocí laserové difrakce, neboli Dynamic light scattering (DLS) – dynamický rozptyl světla je také někdy označována jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) a je jednou z nejrozšířenějších technik měření velikosti a distribuce částic a molekul. Obvykle v oblasti submikronové, ale nejnovější technologie umožňuje měření částic menších než 1 nm.<sup>24</sup>

DLS se typicky používá k charakterizaci částic, které jsou dispergovány nebo rozpuštěny v kapalině. Brownův pohyb částic v suspenzi způsobuje světelný rozptyl o různé intenzitě. Analýza těchto výkyvů intenzity souvisí s rychlostí Brownova pohybu a tím i s velikostí částic, která se dá určit pomocí Stokes – Einsteinova vztahu. Principem měření je sledování časového vývoje fluktuací intenzity rozptýleného světla částicemi. Když totiž světlo dopadá na částici, elektrické pole světla vyvolává kmitavou polarizaci elektronů v molekule, proto částice poskytují sekundární zdroj světla a následně světlo rozptylují. Přístroj stanovuje difuzní koeficient částic, který závisí na teplotě kapaliny a na rozměru suspendovaných částic. Takto získaná hodnota je označována jako hydrodynamický průměr a odpovídá průměru koule, která by za stejných podmínek měla stejný difuzní koeficient, který byl naměřen. Jako zdroj světla se používá monochromatický paprsek, nejčastěji červený laser.<sup>26,27</sup>

Výhodou tohoto přístroje je rychlost a spolehlivost měření, možnost analyzovat široké zastoupení částic s velmi rozdílnými molekulovými vlastnostmi a měření malého množství vzorku, který je třeba jen minimálně upravovat.<sup>26,27</sup>

Nastavení tohoto přístroje je snadné a měření plně automatizované. Jen je třeba před měřením seřídit program určením média, ve kterém je měřený vzorek rozptýlen. Nastavuje se také materiál svými vlastnostmi nejbližší zkoumanému vzorku. Vzorky

je nutné před samotným měřením určitou dobu temperovat na konstantní teplotu, za které bude měření probíhat.<sup>24</sup>



**Obr. 2** – Zetasizer Nano particles analyser series ZEN 3600<sup>25</sup>

## 6 Experimentální část

### 6.1 Použité suroviny

**Tabulka 1** – seznam použitých surovin

Název suroviny	Výrobce (resp. dodavatel)
Prasečí jazyk	Skaličan a. s., Česká Skalice, ČR
Aqua purificata (čištěná voda)	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Aqua purificata (ultračištěná voda)	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 545 marked	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on polyacrylonitrile, Chromeon 470 marked, karboxylované	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Dinatrii phosphas dodecahydricus	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR
Natrii chloridum	Penta Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Carbaethopendecinii bromidum	Slovakofarma a.s., Hlohovec, SR
Orion application solution pH 7.00 Buffer	Thermo electron Co., Waltham, MA, USA
Orion application solution pH 10.01 Buffer	Thermo electron Co., Waltham, MA, USA

Acidum citricum	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR
Natrii carbonas	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR

Pozn.: uvedené suroviny odpovídaly deklarované jakosti podle platných norem jejich výrobců a dodavatelů. Čištěná a ultračištěná voda pro HPLC pocházející z přípravy na FaF UK nebyla podrobena lékopisným zkouškám. Jako další surovina byl použit silikon Lukosan a kyanoakrylátové lepidlo.

## 6.2 Použité přístroje

**Tabulka 2** – seznam použitých přístrojů

Typ přístroje	Výrobce
Předvážky Kern 440-45N	Kern ande Sohn, Balingen, Německo
Lednička s mrazničkou Frigera D118702	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Digitální pH-metr GRYF 209L vybavený pH elektrodou THETA HC 113	Elektr. přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Magnetická míchačka, Fisher Scientific 408 N	Fisher Scientific, Pardubice, ČR
Analytické váhy PIONEER TM PA 430	Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA
DLS – Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Velká Británie
Mikrometr – Absolute Digimatic Indicator ID-S1012B	Mitutoyo, Japonsko
Fluorescenční mikroskop, OLYMPUS BX 51	Olympus, Tokyo, Japonsko
Termostatovaná vodní lázeň Grant JB 5	Grant Co., Velká Británie
Vícemístné ponorné míchadlo	Variomag Telesystem, Německo



## **6.3 Použité metody**

### **6.3.1 Biologický materiál**

K permečním pokusům byly použity jako modelové membrány sublingvální membrány z prasete, které jsou lidské sublingvální membráně podobné. Membrány byly získané z jazyků prasete domácího (*Sus scrofa*, v. *domestica*).

V několika krocích byly z čerstvých vepřových jazyků vypreparovány sublingvální membrány. Z několika prasečích jazyků, zakoupených v masokombinátu Skaličan, byla nejprve odstraněna větší část svaloviny. Poté se sublingvální membrány dočistily jemnou preparací skalpelem. Takto vypreparované sublingvální membrány byly naloženy do fyziologického roztoku a připravené k použití pro permeční pokusy. Jakkoliv poškozené, proděravěné či potřhané membrány nebyly v permečních pokusech použity.

Pro první permeční pokus byly použity prasečí sublingvální membrány dlouhodobě zmrazené (29. 11. 2012), uchovávané po celou dobu v mrazáku v polyethylenové folii. Dne 12. 6. 2013 byly tyto membrány rozmrazeny vložením do fyziologického roztoku temperovaného na 37°C a rozřezány na čtverce vhodné velikosti přibližně 15 min před sestavením permečních cel. Mikrometrem Mitutoyo byla změřena orientačně tloušťka několika membrán připravených k permeaci.

Pro druhý permeční pokus, který byl proveden 19. 6. 2013, byly použity čerstvě vypreparované membrány, které byly stejně jako při prvním experimentu rozřezány na čtverce vhodné velikosti a též byla přeměřena jejich tloušťka mikrometrem.

### 6.3.2 Složení a příprava pufrů

#### Kalibrace pH – metru

Před přípravou fosfátových pufrů dle Sörenseny o pH 7,4 a pH 6,6 byla provedena kalibrace pH – metru Gryf 209 L, vybaveného elektrodou THETA '90 (bev), typ HC 113. Pro kalibraci byly použity dva pufrы, jeden o pH 10,0, druhý o pH 7,0 od firmy Thermo Electron Corporation.

#### Složení fosfátového pufru dle Sörenseny o pH 7,4

Tabulka 3

Surovina	Množství (g)
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	2,1
Dinatrii phosphas dodecahydricus	19,1
Natrium chloratum	4,4
Aqua purificata	Ad 1000,0 ml

#### Příprava fosfátového pufru dle Sörenseny o pH 7,4

V kádince s 500 ml vody byla rozpuštěná daná množství dihydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného za použití magnetické míchačky. Chlorid sodný byl přidán k dihydrogenfosforečnanu sodnému.

Hydrogenfosforečnan sodný byl rozpuštěn v 400 ml vody.

1. Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se postupně přidával roztok hydrogenfosforečnanu, do té doby, než bylo pomocí pH-metru dosaženo požadované pH.

2. Po ustálení dané hodnoty pH se vzniklý roztok doplnil vodou na 1000 ml.

3. Pufr byl převeden do odměrné baňky. Odměrná baňka s připraveným pufrem se uzavřela parafilmem a uchovávala se v ledničce při teplotě 2°C – 6°C bez přístupu světla. Parafilm zabránil vniknutí nečistot do pufru.

#### **Složení fosfátového pufru dle Sørenseny o pH 6,6**

**Tabulka 4**

<b>Suroviny</b>	<b>Množství (g)</b>
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	6,2
Dinatrii phosphas dodecahydricus	9,5
Natrium chloratum	4,9
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

**Příprava fosfátového pufru dle Sørenseny o pH 6,6** byla provedena stejným způsobem jako příprava fosfátového pufru dle Sørenseny o pH 7,4 popsaným výše.

#### **Složení a příprava citrátového pufru o pH 6,6**

V kádince byl připraven roztok uhličitanu sodného ve vodě tak, že bylo rozpuštěno 21,5 g uhličitanu sodného ve 100 ml čištěné vody. V jiné kádince bylo nejprve rozpuštěno 1,4 g kyseliny citronové v 600 ml čištěné vody, poté sem bylo přidáno 10 ml předpřipraveného roztoku uhličitanu sodného.

Takto vzniklý pufr byl doplněn čištěnou vodou na 1000,0 ml a poté znovu přeměřen pH-metrem. Aby měl pufr požadované pH 6,6 bylo nutné do něj přidat ještě 70 ml roztoku kyseliny citronové (0,163 g kyseliny citronové a 70 ml čištěné vody). Celkový objem námi připraveného citrátového pufru o pH 6,6 činil 1070 ml.

Pro další použití bylo nutné všechny pufrы zředit v poměru 1:9. Jeden díl námi připraveného pufru byl smíchán s devíti díly čištěné vody. Pro permeační pokusy byly tedy použity fosfátové pufrы o pH 6,6 a 7,4 a citrátový pufr o pH 6,6. Pufrы byly uchovávány v lednici při teplotě 2°C – 6°C bez přístupu světla.

### **Příprava fosfátových pufrů se surfaktantem**

Při této přípravě byly použity námi předem připravené fosfátové pufrы dle Sørensenova o pH 6,6 a o pH 7,4. Roli surfaktantu nesl Carbaethopendecinií bromidum, kterého bylo rozpuštěno 0,1 g v 100 ml fosfátového pufru. Surfaktant byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru o pH 6,6 i ve fosfátovém pufru o pH 7,4.

### **Příprava ředěných fosfátových pufrů se surfaktantem**

Pro účely permeace bylo nutné námi předpřipravené pufrы se surfaktantem ještě naředit.

Navážka 0,1 g Carbaethopendecinií bromidum byla rozpuštěna ve 100 ml fosfátového pufru o pH 6,6 naředěného čištěnou vodou v poměru 1:9. Poté bylo odebráno 25 ml takto připraveného roztoku a přeneseno do 100 ml odměrné baňky a doplněno naředěným pufrém po rysku. Tento roztok pufru byl následně zfiltrován přes jednorázový PTFE filtr s velikostí pórů 0,22 µm.

Stejného postupu bylo využito i při přípravě ředěného fosfátového pufru se surfaktantem o pH 7,4.

Oba ředěné pufrы se surfaktantem byly skladovány v odměrných baňkách uzavřených parafinem v temné lednici při teplotě 2°C až 6°C.

### **6.3.3 Stanovení hodnoty pH vzorků disperzí nanočástic**

Před samotným přeměřováním vzorků byl pH metr kalibrován pomocí pufrů o pH 6,00 a pH 10,01. Ke stanovení příslušné hodnoty disperze nanočástic byla měrná

elektroda pH metru vložena do celého vzorku nanočástic. Před každým měřením byla tato elektroda opláchnuta destilovanou vodou a jemně osušena buničinou.

Hodnoty pH byly měřeny u šesti vzorků disperzí nanočástic (Sigma-Aldrich, Praha). Vzorky byly z čistě praktického hlediska označeny A – F.

Vzorky A a B byly složeny ze síťovaného polymeru PD, značené fluorescenčním barvivem Chromeonem 470 a byly totožné výrobní šarže. Ve vzorcích C a D byly nanočástice karboxylované, založené na polymeru PD a značené Chromeonem 470. C a D nebyly ze stejné šarže, přičemž u vzorku C bylo měření pH obtížnější kvůli jeho malému množství. Vzorek E se skládal z karboxylovaných nanočástic polyakrylonitrilu (PAN) a byl značen Chromeonem 470. Vzorek disperze nanočástic F byl založen na polymeru PD a byl značený Chromeonem 545.

Naměřené hodnoty pH disperzí shrnuje **tabulka 8 (viz oddíl 7.1)**.

#### **6.3.4 Měření velikosti nanočástic v disperzi**

Analýza velikosti částic v disperzi byla provedena metodou laserové difrakce (DLS) přístrojem Zetasizer Nano series ZS. Stanovované množství vzorku nanočástic bylo před měřením rozptýleno v příslušném médiu a přefiltrováno přes jednorázový filtr PTFE o velikost pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly nachystané pomocí pipety přímo do kyvety určené k měření. Každý vzorek byl poté námi v kyvetě jemně promíchán a přímo v přístroji byl chvilku temperován na teplotu 25°C.

Stanovení bylo provedeno u vzorků disperzí nanočástic A – F (**viz oddíl 6.3.3**). Jako médium byla použita čištěná voda a fosfátový pufr připravený podle Sørensenova o pH 6,6 a o pH 7,4, dále ředěné varianty těchto fosfátových pufrů (1:9), fosfátové pufrы se surfaktantem a jejich ředěné varianty.

V softwaru DTS byla jako disperzní prostředí nastavena voda a jako materiál byl nastaven polystyrenový latex.

**Tabulka 5** – složení vzorků pro DLS

<b>Vzorek</b>	<b>Množství disperze nanočástic</b>	<b>Médium ad 1 ml</b>
<b>1.</b>	20 $\mu$ l	Čištěná voda
<b>2.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr o pH 6,6
<b>3.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr o pH 7,4
<b>4.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr o pH 6,6 ředěný
<b>5.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr o pH 7,4 ředěný
<b>6.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem o pH 6,6
<b>7.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem o pH 7,4
<b>8.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem o pH 6,6 ředěný
<b>9.</b>	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem o pH 7,4 ředěný

#### **Postup přípravy vzorků pro DLS:**

Při přípravě prvních vzorků disperzí A-F (**viz oddíl 6.3.3**) pro zjištění zastoupení velikosti přítomných zkoumaných nanočástic byla jako první médium použita čištěná voda.

Nejprve byl čištěnou vodou propláchnut bakteriální filtr (PTFE 0,2  $\mu$ m, blue with prefilter, Sartorius), poté bylo přefiltrováno větší množství média, které bylo použito na vypláchnutí jednorázových kyvet a samotné přípravě vzorků.

Pipetou bylo odebráno 980  $\mu$ l přefiltrované čištěné vody a přeneseno do vypláchnuté kyvety, následně bylo do této kyvety přidáno 20  $\mu$ l nanočástic A pomocí mikropipety, pak byla kyveta překryta parafinem. Tímto byl vzorek připraven k DLS měření.

Tentýž postup s čištěnou vodou jako médiem následoval i u vzorků B, C, D, E a F. Vše se opakovalo i s ostatními médii, kterými byly fosfátové pufrů (pH 6,6 a 7,4), jejich ředěné varianty 1:9 (pH 6,6 a 7,4), fosfátové pufrů se surfaktantem (pH 6,6 a 7,4) a ředěné fosfátové pufrů se surfaktantem 1:9 (pH 6,6 a 7,4) u vzorků nanočástic A-F (**viz oddíl 6.3.3**).

### **6.3.5 Desintegrace shluků**

Poté, co bylo metodou měření distribuce velikosti nanočástic (DLS) zjištěno, že ve fosfátovém pufru o pH 6,6 a pH 7,4 dochází k agregaci nanočástic bylo další měření prováděno s ředěnými variantami těchto pufrů, tedy fosfátovými pufrů o pH 6,6 a pH 7,4 ředěnými čištěnou vodou v poměru 1:9. Testováno bylo také přidání surfaktantu (Carbaethopendecinii bromidum) do pufrů neředěných i ředěných čištěnou vodou 1:9 za účelem snížení povrchové napětí.

### 6.3.6 Uskutečnění permeačních pokusů

Permeační pokusy probíhaly v takzvaných modifikovaných Franzových difúzních celách (viz obr. 2). Tato cela se skládá ze spodní části, jež se plní akceptorovou fází a vkládá se do ní míchadélko, střední částí - dvou plexiskel s kruhovým otvorem, který vymezuje permeační plochu vkládané membrány ( $1\text{ cm}^2$ ) a vrchním kloboučkem, sloužícím k nanášení donorové fáze. Cela drží při sobě díky dvěma kolíčkům a pryžovým gumičkám.



**Obr. 3** – Modifikovaná Franzova difúzní cela

Nejdříve byly naplněny spodní části cel akceptorovou fází (fosfátový pufr dle Sørensenova ředění 1:9 o pH 7,4, 20 ml) za použití stříkačky a bylo do nich vloženo elektromagnetické míchadélko. Bylo nutné dávat pozor, aby se společně s akceptorovou fází nedostal do cely vzduch, který by zkreslil výsledky měření. Přebytky pufrů, které nám zůstaly v 20 ml stříkačce po naplnění spodní části cely, byly převedeny do kalibrovaných zkumavek, díky kterým bylo možné určit přesný objem akceptorového pufru v této části.



Při sestavování cel bylo nutné postupovat velmi opatrně, aby se membrány při vkládání mezi plexiskla nepotrhaly a zůstaly stále napnuté. K upevnění membrán mezi plexiskly bylo u obou permeačních pokusů použito u cel 1. – 4. kyanoakrylátové lepidlo a u cel 5. – 12. silikon Lukosan.

Po sestavení bylo nutné cely temperovat alespoň hodinu v lázni nastavené na 37°C, aby všechny cely měly konstantní teplotu. Zároveň byla akceptorová fáze míchána magnetickým míchadlem. Po vytemperování cel bylo do horní části cely, definované otvorem v plexiskle, přímo na membránu nanášeno pomocí mikropipety 200 µl donorové fáze. Jako donorové médium byl použit fosfátový pufr o pH 6,6 dle Sørensenova (ředěný 1:9) a pufr citrátový o pH 6,6 (ředěný 1:9). Do obou pufrů byl jako ukazatel celistvosti membrány přidán kofein v množství 0,25 g v 50 ml pufru a nanočástice vzorku A (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked).

#### **Složení donorových pufrů:**

1. 1600 µl fosfátového pufru podle Sørensenova o pH 6,6 ředěného 1:9 s 0,5% kofeinu a 400 µl nanočástic ze vzorku D (**viz oddíl 6.3.3**)
2. 800 µl citrátového pufru o pH 6,6 ředěného 1:9 s 0,5% kofeinu a 200 µl nanočástic A (**viz oddíl 6.3.3**)

Nanočástice rozptýlené v donorovém fosfátovém pufru byly pomocí pipety dávkovány v množství 200 µl do 1. – 8. Franzovy cely, nanočástice v pufru citrátovém byly pipetovány ve stejném množství do 9. až 12. Franzovy cely. Po nanášení donorových fází byly kompletní cely překryty ještě krycími sklíčky, aby nedošlo během pokusu k nežádoucímu odpařování média.

V předběžně stanovených časových intervalech, tedy po 1, 3, 5, 7, 18 a 24 hodinách, od nástřiku donoru na membránu byly odebírány vzorky akceptorové fáze o objemu 1 ml do vialek, které byly ihned uzavírány víčkem. Takto odebrané

množství akceptorového média bylo ihned doplněno ze zásobního vytemperovaného akceptorového pufru o pH 7,4. Po uplynutí 24 hodin byl naposledy odebrán vzorek akceptorové fáze a permeační pokus byl ukončen, toto množství už se zásobním pufrům nedoplňovalo. Zavičkované vialky s odebranými vzorky byly uloženy do ledničky o teplotě 2°C – 6°C. Permeační cely byly rozebrány a vyjmuté sublingvální membrány byly ihned zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem nebo pro pozdější mikroskopování zataveny do polyethylenové folie, zmrazeny dusíkem a uloženy do mrazáku.

Při první permeaci se pracovalo s dlouhodobě zmraženými prasečími sublingválními membránami (29. 11. 2012), které byly po celou dobu zatavené v polyethylenové folii uložené v mrazáku. Při druhém permeačním pokusu se již pracovalo s čerstvě vypreparovanými membránami naloženými ve fyziologickém roztoku. Pro stanovení obsahu nanočástic v akceptorové fázi bylo využito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Data získaná touto metodou jsou zpracována v **oddíle 7**.

### **6.3.7 Příprava kalibračních vzorků**

1. Zásobní roztoku fosfátového pufru s kofeinem byl připraven v odměrné baňce rozpuštěním 0,25 g kofeinu v 50 ml fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 7,4 ředěného 1:9. Tento roztok byl 0,5 % (500 mg%), který byl následně ještě 100x naředěn. Koncentrace prvního vzorku kalibrační řady tedy činila 0,005 % (5 mg%). Následným ředěním tohoto vzorku byla získána celá kalibrační řada.

**Tabulka 6** – složení kalibračních vzorků s kofeinem

<b>Poměr ředění</b>	<b>Zásobní roztok 5 mg% (ml)</b>	<b>Fosfátový pufr o pH 7,4 (ml)</b>	<b>Koncentrace (mg%)</b>
1	20	0	5
1/2	10	10	2,5
1/3	6,66	13,33	1,66
1/4	5	15	1,25
1/9	2,22	17,77	0,55

2. Zásobní roztok nanočástic byl připraven smícháním 50  $\mu$ l 0,5 % (500 mg%) disperze nanočástic (PD Chromeon 470 – marked) a 10 ml fosfátového pufru ředěného 1:9 o pH 7,4 dle Sörensena. Takto byl vytvořen roztok o koncentraci 0,0025 % (2,5 mg%), který byl využit pro další ředění na vytvoření kalibrační řady.

**Tabulka 7** – složení kalibračních vzorků nanočástic v pufru

<b>Podíl zásobní disperze (ml)</b>	<b>Zásobní roztok (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Fosfátový pufr o pH 7,4 (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Koncentrace (mg%)</b>
20	200	800	0,5
10	100	900	0,25
5	50	950	0,125
2,5	25	975	0,0625
1,25	12,5	987,5	0,0313
0,625	6,25	993,75	0,0156
0,312	3,13	996,87	0,0078
0,156	1,56	998,44	0,0039

### 6.3.8 Měření koncentrací v kalibračních a permeačních vzorcích

Stanovení koncentrace nanočástic v odebraných vzorcích akceptorových fází a v kalibračních vzorcích bylo provedeno systémem HPLC. Pro detekci kalibračních vzorků kofeinu byl využit UV/VIS detektor s nastavením vlnové délky  $\lambda = 272$  nm a pro akceptorové vzorky s nanočásticemi fluorescenční detektor ( $\lambda_{em} = 600$  nm;  $\lambda_{ex} = 470$  nm). Mobilní fází byl metanol a voda v poměru 1:3, průtoková rychlost byla 0,5 ml/min.

Zprůměrováním hodnot dvou po sobě následujících měřeních byla zjištěna koncentrace všech odebraných vzorků akceptorového média. Hodnoty koncentrací bylo nutno korigovat na odebraný objem v šabloně pro zpracování výsledků. Protokoly získané touto korekcí jsou uvedené v oddíle **PŘÍLOHY**. Z hodnot měřených kalibračních vzorků kofeinu byla metodou lineární regrese vytvořena kalibrační přímka (viz **oddíl 7.4**).

### 6.3.9 Fluorescenční mikroskopie

Poté, co bylo zjištěno metodou DLS, že nanočástice se v neředěných fosfátových pufrách o pH 6,6 a o pH 7,4 shlukují, byly tyto aglomeráty vzorku disperze nanočástic D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované) zkoumány fluorescenčním mikroskopem. Na podložní sklíčko byla mikropipetou nanесena kapka vzorku, jež byla následně překryta krycím sklíčkem a za použití imerzního oleje mikroskopována (viz **oddíl 7.3**).

Fluorescenční mikroskop též umožnil pozorovat prasečí sublingvální membrány použité v permeačních pokusech. Dlouhodobě zmrazené i nativní membrány byly po ukončení permeačních pokusů mikroskopovány ze strany donorové i akceptorové. Membrány byly vloženy na podložní sklíčko a překryty krycím sklíčkem. Sledována byla především vnitřní část membrány ohraničená kruhovým otvorem plexiskel, přes kterou permeace probíhala. (viz **oddíl 7.6**)

## 7 Výsledky a diskuse

Před uskutečněním permeačních pokusů bylo naším úkolem zjistit, co největší množství informací o námi zkoumaných nanočásticích značených fluorescenčním barvivem. Zajímaly nás především velikosti nanočástic v disperzích (metoda DLS), pH těchto disperzí a chování samotných nanočástic v disperzích i jejich agregační vlastnosti po smíchání s příslušnými pufrů. V neposlední řadě vliv použitých dlouhodobě zmražených sublingválních membrán a membrán čerstvých na průnik těchto nanočástic skrz membrány.

Předmětem našeho zájmu byly také vlivy pufrů jako médií na podmínky permeace. Jako akceptorové médium byl zvolen Sørensenův fosfátový pufr o pH 7,4 ředěný 1:9, který *in vitro* simuloval prostředí systémového oběhu v lidském organismu. Do fosfátových pufrů byl ještě přidáván surfaktant Carbaethopendeciniibromidum (čínidlo u metod micelární extrakce a separace) kvůli snížení mezifázové energie.<sup>28,29</sup>

Donorové fáze zastupovaly dva pufrů. Prvním byl pufr fosfátový dle Sørensenaa o pH 6,6 ředěný 1:9 a druhým byl pufr citrátový o pH 6,6 také ředěný 1:9. Tato donorová média představovala svým složením přirozené prostředí dutiny ústní.

Přístroje, stejně tak jako metody využité v experimentální části této práce byly ověřeny dlouhodobým používáním na katedře farmaceutické technologie.

### 7.1 Hodnoty pH disperzí nanočástic

Měření hodnot pH jednotlivých vzorků disperzí nanočástic je popsáno v **oddíle 6.3.3**. Výsledné hodnoty pH disperzí nanočástic uvádí **tabulka 8**, tyto hodnoty se navzájem příliš neliší, nehledě na konkrétní typ nanočástic. Výjimku tvoří hodnota pH vzorku C, zapříčiněná jeho malým množstvím, které nedovolilo zcela potopit měrnou elektrodu pH metru do tohoto vzorku. Proto bude tato hodnota z celkového

posuzování vynechána. Průměrné pH všech vzorků nanočástic činilo 6,7 (bez vzorku nanočástic C).

**Tabulka 8** – naměřené hodnoty pH disperzí nanočástic

Označení vzorku	Typ disperze nanočástic	Hodnota pH
<b>A</b>	Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked	6,7
<b>B</b>	Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked	6,72
<b>C</b>	Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated	7,67
<b>D</b>	Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated	6,54
<b>E</b>	Nano beads based on polyacrylonitril, Chromeon 470 marked, carboxylated	6,66
<b>F</b>	Nano beads based on PD, Chromeon 545 marked	6,88
Průměrné pH vzorků (mimo vzorku C)		$6,7 \pm 0,1095$

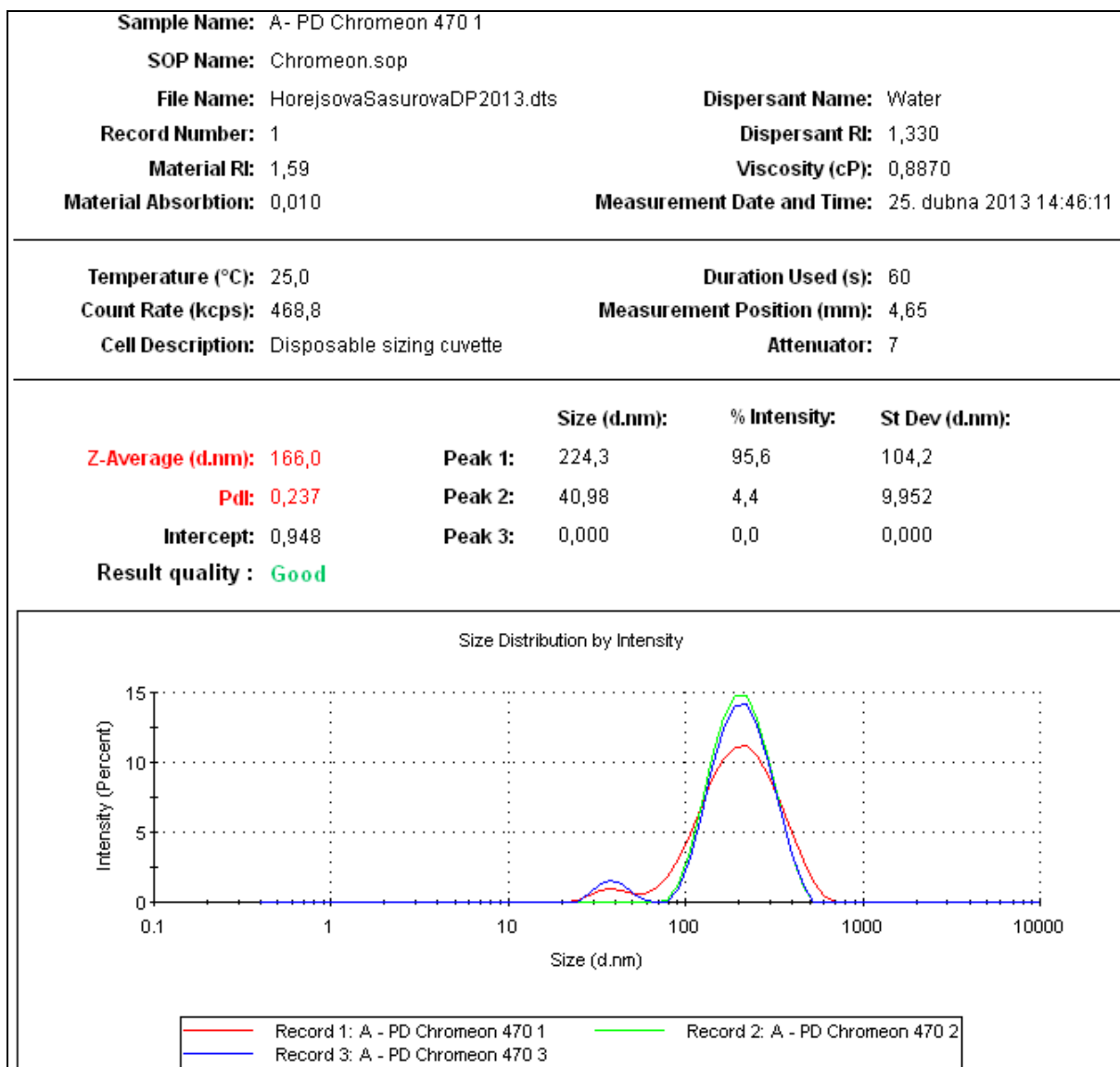
## **7.2 Zastoupení velikosti částic v disperzích měřené metodou DLS**

Měření distribuce velikosti nanočástic pomocí laserové difrakce sloužilo ke zjištění chování nanočástic v příslušných médiích, především jejich potenciální shlukování do větších agregátů, které by teoreticky mohly bránit anebo znesnadnit průnik nanočástic přes sublingvální membránu při permeačních pokusech. Agregace je schopnost nanočástic tvořit energeticky výhodnější soustavu, je ale procesem nežádoucím hlavně proto, že zásadně mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Dále

byly zvažovány možnosti desintegrace těchto aglomerátů a to především volbou příhodného média.

Způsob měření zastoupení velikosti částic v disperzích a přípravy vzorků pro toto měření je zpracováno v **oddíle 6.3.4.**

**Obr. 4** – Ukázka dat získaných programem DTS; zastoupení velikosti nanočástic v disperzi vzorku A dle intenzity rozptýleného světla



Z výsledků měření z DLS bylo zjištěno, že vzorky nanočástic rozptýlené v čištěné vodě jako médiu ani ve fosfátových pufrech shluky netvoří, kromě karboxylovaných vzorků C a D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) dispergovaných ve fosfátových pufrech o pH 6,6 a o pH 7,4, které aglomeráty vytvářejí. Vzorek E (Nano beads based on polyacrylonitril, Chromeon 470 marked, carboxylated) byl karboxylovaný a aglomeráty netvořil.

Pro další analýzu bylo využito vzorků C a D (oba Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované, rozdílné šarže), přičemž shluky tvořil jen vzorek D. Srovnáváním těchto vzorků byl zkoumán vliv médií na tvorbu agregátů. Měření proběhlo na DLS a postup přípravy vzorků je popsán v **oddíle 6.3.4 a 6.3.5**.

**Tabulky 9 – 14** shrnují výsledky měření vzorků A – F dispergovaných v čištěné vodě a ve fosfátových pufrech dle Sørensenova o pH 6,6 a o pH 7,4. Aglomeráty vytvořené ve vzorcích D a F nám dokazují naměřené velikosti částic v těchto vzorcích, které jsou mnohonásobně větší než u ostatních vzorků. Tyto hodnoty jsou zvýrazněny v **tabulce 12 a 14**. Není zcela jasné, co způsobilo agregaci v našich vzorcích, je však nutné brát v úvahu stáří vzorků nanočástic a jejich opakované ohřívání a ochlazování při manipulaci s nimi nebo vysokou koncentraci fosfátových pufrů.



**Tabulka 9** – Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku A, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek A	Měření	Z- Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
Čištěná voda	1	166,0	0,237	224,3	41,0	95,6	4,4
	2	168,2	0,220	216,5	0	100,0	0
	3	168,7	0,217	219,5	39,0	94,5	5,5
	Průměr	167,6	0,225	220,1	26,7	96,7	3,3
	SD	1,4	0,011				
Fosfátový pufr pH 6,6	1	165,8	0,232	221,4	43,0	93,2	6,8
	2	169,5	0,232	224,9	37,2	94,9	5,1
	3	165,2	0,231	221,3	40,5	94,0	6,0
	Průměr	166,8	0,232	222,5	40,2	94,0	6,0
	SD	2,3	0,001				
Fosfátový pufr pH 7,4	1	171,2	0,230	234,4	54,8	90,9	9,1
	2	171,5	0,224	225,4	40,5	94,1	5,9
	3	167,5	0,248	230,2	49,6	92,7	7,3
	Průměr	170,1	0,234	230	48,3	92,6	7,4
	SD	2,2	0,012				

**Tabulka 10** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku B, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek B	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Čištěná voda</b>	1	167,2	0,222	221,5	42,4	94,3	5,7
	2	164,9	0,223	218,9	42,5	93,6	6,4
	3	166,3	0,219	218,1	40,3	93,7	6,3
	Průměr	166,1	0,221	219,5	41,7	93,9	6,1
	SD	1,2	0,002				
<b>Fosfátový pufr pH 6,6</b>	1	167,4	0,237	226,8	40,6	94,0	6,0
	2	168,7	0,240	229,9	43,6	93,1	6,9
	3	168,7	0,238	224,7	38,1	94,8	5,2
	Průměr	168,3	0,238	227,1	40,8	94,0	6,0
	SD	0,8	0,002				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4</b>	1	170,7	0,233	228,4	45,5	93,1	6,9
	2	169,0	0,230	227,8	47,4	93,8	6,2
	3	171,8	0,236	236,9	56,3	91,4	8,6
	Průměr	170,5	0,233	231,0	49,7	92,8	7,2
	SD	1,4	0,003				

**Tabulka 11** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku C, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek C	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Čištěná voda</b>	1	193,6	0,197	243,7	0,0	100,0	0,0
	2	190,1	0,233	250,0	0,0	100,0	0,0
	3	196,7	0,199	245,6	0,0	100,0	0,0
	Průměr	193,5	0,210	246,4	0,0	100,0	0,0
	SD	3,3	0,020				
<b>Fosfátový pufr pH 6,6</b>	1	197,8	0,229	266,3	54,1	93,6	6,4
	2	202,2	0,211	261,5	51,0	94,0	6,0
	3	201,6	0,203	255,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr	200,5	0,214	261,2	35,0	95,9	4,1
	SD	2,4	0,013				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4</b>	1	201,7	0,235	272,4	59,8	94,3	5,7
	2	203,2	0,210	263,2	53,0	94,3	5,7
	3	203,1	0,223	273,8	68,3	91,3	8,7
	Průměr	202,7	0,223	269,8	60,3	93,3	6,7
	SD	0,8	0,013				

**Tabulka 12** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku D, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek D	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Čištěná voda</b>	1	102,1	0,234	105,9	3075,0	91,5	8,5
	2	101,4	0,223	114,8	3939,0	95,6	4,4
	3	103,5	0,212	138,9	0,0	100,0	0,0
	Průměr	102,3	0,223	119,9	2338,0	95,7	4,3
	SD	1,1	0,011				
<b>Fosfátový pufr pH 6,6</b>	1	3027	0,406	1900	204,7	94,1	5,9
	2	2917	0,535	1604	4955	54,6	45,4
	3	2692	0,622	4766	1262	61,6	38,4
	Průměr	2878,7	0,521	2756,7	2140,6	70,1	29,9
	SD	170,8	0,109				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4</b>	1	4528	0,608	1349	0,0	100,0	0,0
	2	5094	0,546	1054	0,0	100,0	0,0
	3	4439	0,469	1547	0,0	100,0	0,0
	Průměr	4687,0	0,541	1316,7	0,0	100,0	0,0
	SD	355,0	0,070				

**Tabulka 13** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku E, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek E	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Čištěná voda</b>	1	102,5	0,206	126,7	0,0	100,0	0,0
	2	103,5	0,201	130,3	0,0	100,0	0,0
	3	103,0	0,222	138,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr	103,0	0,210	131,9	0,0	100,0	0,0
	SD	0,5	0,011				
<b>Fosfátový pufr pH 6,6</b>	1	98,5	0,198	125,1	0,0	100,0	0,0
	2	100,0	0,213	129,8	0,0	100,0	0,0
	3	101,0	0,223	129,8	0,0	100,0	0,0
	Průměr	99,8	0,211	128,2	0,0	100,0	0,0
	SD	1,3	0,013				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4</b>	1	100,5	0,198	119,9	0,0	100,0	0,0
	2	100,7	0,199	128,0	0,0	100,0	0,0
	3	100,8	0,199	130,2	0,0	100,0	0,0
	Průměr	100,7	0,199	126,0	0,0	100,0	0,0
	SD	0,2	0,001				

**Tabulka 14** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku F, médium – neředěné fosfátové pufr

Vzorek F	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Čištěná voda</b>	1	134,1	0,190	167,6	0,0	100,0	0,0
	2	133,0	0,185	164,7	0,0	100,0	0,0
	3	133,5	0,213	172,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr	133,5	0,196	168,3	0,0	100,0	0,0
	SD	0,6	0,015				
<b>Fosfátový pufr pH 6,6</b>	1	2391	0,406	2837	204,9	94,8	5,2
	2	2481	0,492	3894	719,6	83,6	16,4
	3	2307	0,567	1829	0,0	100,0	0,0
	Průměr	2393,0	0,488	2853,3	308,2	92,8	7,2
	SD	87,0	0,081				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4</b>	1	3360	0,379	2414	0,0	100,0	0,0
	2	3323	0,527	1695	5219	57,4	35,5
	3	3228	0,353	2397	5560	96,1	3,9
	Průměr	3303,7	0,420	2168,7	3593,0	84,5	13,1
	SD	68,1	0,094				

Pro další sledování vlivu použitých médií na vytváření agregátů byly zvoleny vzorky C a D, které byly mezi sebou srovnávány. Oba vzorky se skládaly z karboxylovaných nanočástic založených na polymeru PD, značené Chromeonem 470, které se lišily výrobní šarží. Porovnávány byly vzorky rozptýlené ve fosfátových pufrch o pH 6,6 a 7,4 s přidavkem surfaktantu, ve fosfátových pufrch o pH 6,6 a 7,7 ředěných 1:9 a ve fosfátových pufrch o pH 6,6 a 7,4 ředěných 1:9

s přidavkem surfaktantu. Postup měření je popsán v **oddíle 6.3.4** a výsledné hodnoty měření velikosti částic obsahuje **tabulka 15-20**.

**Tabulka 15** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku C, médium – neředěné fosfátové pufrы se surfaktantem

Vzorek C	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 +surfaktant</b>	1	947,8	0,706	566,8	145,0	84,9	15,1
	2	1195	0,766	525,4	122,0	88,8	11,2
	3	967,0	0,859	987,9	195,5	78,9	21,1
	Průměr	1036,6	0,777	693,4	154,2	84,2	15,8
	SD	137,5	0,077				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 +surfaktant</b>	1	3624	1,000	380,8	0,0	100,0	0,0
	2	2438	1,000	569,3	0,0	100,0	0,0
	3	2446	1,000	484,6	0,0	100,0	0,0
	Průměr	2836	1,000	478,2	0,0	100,0	0,0
	SD	682,4	0,000				

**Tabulka 16** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku D, médium – neředěné fosfátové pufrы se surfaktantem

Vzorek D	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 +surfaktant</b>	1	939,6	0,752	531,5	112,7	80,4	19,6
	2	715,1	0,819	841,9	186,5	63,0	37,0
	3	549,6	0,807	932,8	190,1	55,2	32,8
	Průměr	734,8	0,793	768,7	163,1	71,7	29,8
	SD	195,7	0,036				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 +surfaktant</b>	1	634,9	0,735	625,5	135,7	72,7	27,3
	2	486,1	0,784	1052	314,8	58,9	30,0
	3	484,0	0,787	808,4	171,4	61,3	27,0
	Průměr	535,0	0,769	828,6	207,3	64,3	28,1
	SD	86,5	0,029				

**Tabulky 15 a 16** uvádějí výsledky měření zastoupení velikosti nanočástic vzorků C a D dispergovaných ve fosfátových pufrách o pH 6,6 a 7,4 se surfaktantem.

Srovnáním výsledků DLS měření vzorků nanočástic dispergovaných ve fosfátových pufrách a ve fosfátových pufrách se surfaktantem získáme tyto informace:

- vzorek C ve fosfátových pufrách bez surfaktantu netvořil okem viditelné sraženiny, naměřená průměrná velikost nanočástic ve fosfátovém pufru o pH 6,6 činila 200,5 d.nm, v pufru o pH 7,4 202,7 d.nm



- vzorek C ve fosfátových pufrch se surfaktantem tvořil v květetě jemný zákal, průměrná velikost částic se zvětšila – ve fosfátovém pufru o pH 6,6 byla 1036,6 d.nm a pro pufr o pH 7,4 a 2836 d.nm
- vzorek D ve fosfátových pufrch bez surfaktantu tvořil shluky, průměrná velikost částic naměřená metodou DLS byla ve fosfátovém pufru o pH 6,6 2878,7 d.nm a v pufru o pH 7,4 4687 d.nm
- ve vzorku D ve fosfátových pufrch se surfaktantem byly naměřeny několikanásobně menší částice, jejich zjištěná průměrná velikost byla ve fosfátovém pufru o pH 6,6 734,8 d.nm a v pufru o pH 7,4 535 d.nm, shluky se tedy přidáním surfaktantu zmenšily

Chování vodných roztoků obsahujících polymery a povrchově aktivní látky a interakcemi mezi jednotlivými složkami těchto systémů popisuje studie G.Niziri a kol. (Nanostructures Formed by Self-Assembly of Negatively Charged Polymer and Cationic Surfactants). Studie říká, že tenzidy mají tendenci se v roztocích vázat na polymery a to při takové koncentraci surfaktantu, která je označována jako kritická koncentrace agregace (je nižší než kritická micelární koncentrace surfaktantu). U opačně nabitých elektrolytů dochází v určitém koncentračním rozmezí k vysrážení polymeru, nicméně bylo zjištěno, že vázání surfaktantu do polymeru může dojít bez sraženin, za tvorby malých rozptýlených komplexů.<sup>30</sup>

Studie se zabývá formováním nanočásticových interakcí polyaniontu a kationtové povrchově aktivní látky při různých molárních poměrech, které ovlivňují velikost a zeta potenciálu vytvořených nanočástic. Tento poměr nemá významný vliv na vnitřní uspořádání částic, zajímavější je efekt délky řetězce surfaktantu. Průměrná velikost částic roste se zvyšující se délkou řetězce surfaktantu, tím je částice více hydrofobní a má schopnost agregovat. Tímto by se dal vysvětlit nárůst velikosti částic po dispergaci v ředěných pufrch se surfaktantem, především u vzorku C.<sup>30</sup>

Z tabulek 17 a 18 můžeme vypočítat, že použitím ředěných fosfátových pufrů k dispergaci nanočástic se významně zmenšily jejich velikosti, tudíž rozměry částic ve vzorcích C a D jsou více podobné velikosti typické pro nanočástice.

**Tabulka 17** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku C, médium – fosfátové pufrы ředěné 1:9

Vzorek C	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9</b>	1	193,2	0,227	255,3	46,2	96,8	3,2
	2	192,5	0,217	250,7	44,9	96,5	3,5
	3	192,8	0,197	245,7	50,2	95,4	4,6
	Průměr	192,8	0,214	250,6	47,1	96,2	3,8
	SD	0,4	0,015				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9</b>	1	197,2	0,198	248,7	0,0	100,0	0,0
	2	193,6	0,193	244,8	0,0	100,0	0,0
	3	194,9	0,210	251,0	47,3	94,7	5,3
	Průměr	195,2	0,200	248,2	15,8	98,2	1,8
	SD	1,8	0,009				

**Tabulka 18** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku D, médium - fosfátové pufrы ředěné 1:9

Vzorek D	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9</b>	1	100,8	0,222	109,6	3619	94,4	5,6
	2	100,4	0,228	115,7	4601	97,0	3,0
	3	99,4	0,228	110,3	3883	94,6	5,4
	Průměr	100,2	0,226	111,9	4034,3	95,3	4,7
	SD	0,7	0,003				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9</b>	1	100,0	0,228	123,2	4272	97,4	2,6
	2	98,5	0,229	112,4	2969	94,4	5,6
	3	98,2	0,231	112,1	3413	94,6	5,6
	Průměr	98,9	0,229	115,9	3551,3	95,5	4,6
	SD	1,0	0,002				

**Tabulka 19** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku C, médium – fosfátové pufrы ředěné 1:9 se surfaktantem

Vzorek C	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9 +surfaktant</b>	1	903,2	0,731	427,5	96,2	86,5	13,5
	2	659,3	0,693	548,1	144,7	82,3	17,7
	3	702,0	0,738	589,2	129,0	81,2	18,8
	Průměr	754,8	0,721	521,6	123,3	83,3	16,7
	SD	130,3	0,024				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9 +surfaktant</b>	1	650,7	0,650	442,9	117,8	81,7	18,3
	2	612,0	0,517	408,6	85,3	90,9	9,1
	3	474,3	0,688	690,7	215,6	54,4	43,5
	Průměr	579,0	0,618	514,1	139,6	75,7	23,6
	SD	92,7	0,090				

**Tabulka 20** - Výsledky z DLS – velikost částic v disperzi vzorku D, médium – fosfátové pufrы ředěné 1:9 se surfaktantem

Vzorek D	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)
<b>Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9 +surfaktant</b>	1	437,8	0,523	640,8	141,0	69,4	29,1
	2	359,8	0,806	618,9	114,6	63,2	22,6
	3	354,3	0,769	773,6	166,1	56,5	32,7
	Průměr	384,0	0,699	677,8	140,6	63,0	28,1
	SD	46,7	0,154				
<b>Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9 +surfaktant</b>	1	279,7	0,471	159,7	979,0	49,0	48,1
	2	273,1	0,449	744,9	153,2	52,9	44,0
	3	274,6	0,456	405,0	4704,0	92,5	7,5
	Průměr	275,8	0,459	436,5	1945,4	64,8	33,2
	SD	3,5	0,011				

**Tabulky 19 a 20** shrnují výsledky měření vzorků C a D ve fosfátových pufrech o pH 6,6 a 7,4 s přidaným surfaktantem. Naměřené hodnoty však nejsou tolik vyhovující, jako u vzorků dispergovaných v ředěných pufrech bez surfaktantu, ale ani tolik odlišné jako u vzorků v samotných fosfátových pufrech se surfaktantem.

Hodnoty naměřené DLS přístrojem lze shrnout takto:

**Vzorek A**      a čišťená voda -  $167,6 \pm 1,4$  nm  
                     a fosfátový pufr o pH 6,6 -  $166,8 \pm 2,3$  nm  
                     a fosfátový pufr o pH 7,4 -  $170,1 \pm 2,2$  nm

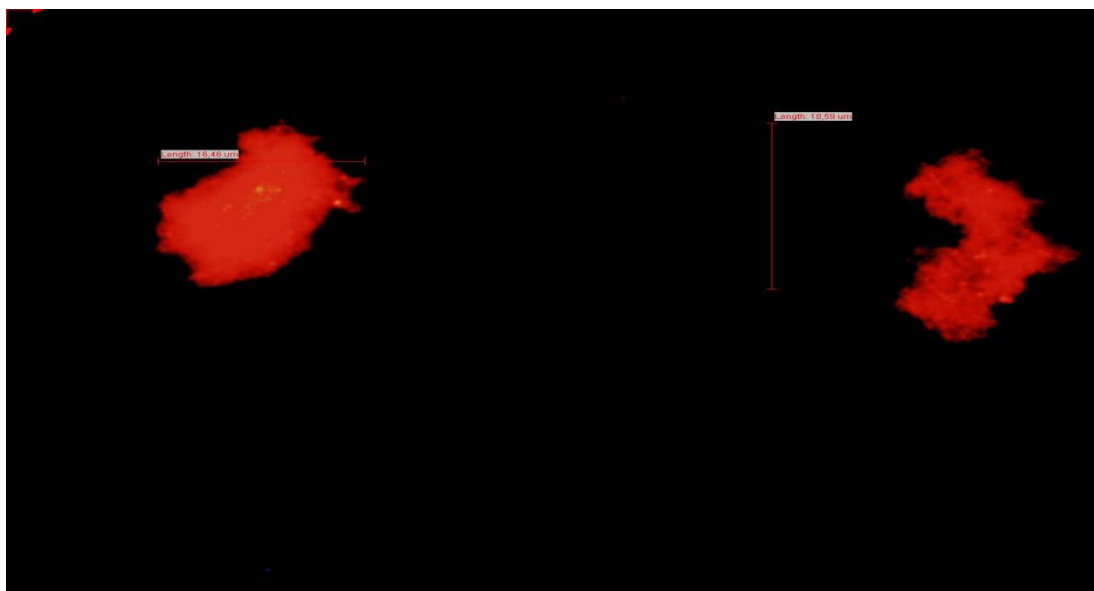
**Vzorek B**      a čišťená voda -  $166,1 \pm 1,2$  nm  
                     a fosfátový pufr o pH 6,6 –  $168,3 \pm 0,8$  nm

	a fosfátový pufr o pH 7,4 - $170,5 \pm 1,4$ nm
<b>Vzorek C</b>	a čištěná voda - $193,5 \pm 3,3$ nm
	a fosfátový pufr o pH 6,6 - $200,5 \pm 2,4$ nm
	a fosfátový pufr o pH 7,4 - $202,7 \pm 0,8$ nm
<b>Vzorek D</b>	a čištěná voda - $102,3 \pm 1,1$ nm
	a fosfátový pufr o pH 6,6 - $2878,7 \pm 170,8$ nm
	a fosfátový pufr o pH 7,4 - $4687,0 \pm 355,3$ nm
<b>Vzorek E</b>	a čištěná voda - $103,0 \pm 0,5$ nm
	a fosfátový pufr o pH 6,6 - $99,8 \pm 1,3$ nm
	a fosfátový pufr o pH 7,4 - $100,7 \pm 0,2$ nm
<b>Vzorek F</b>	a čištěná voda - $133,5 \pm 0,6$ nm
	a fosfátový pufr o pH 6,6 - $2393,0 \pm 87,0$ nm
	a fosfátový pufr o pH 7,4 - $3303,7 \pm 68,1$ nm

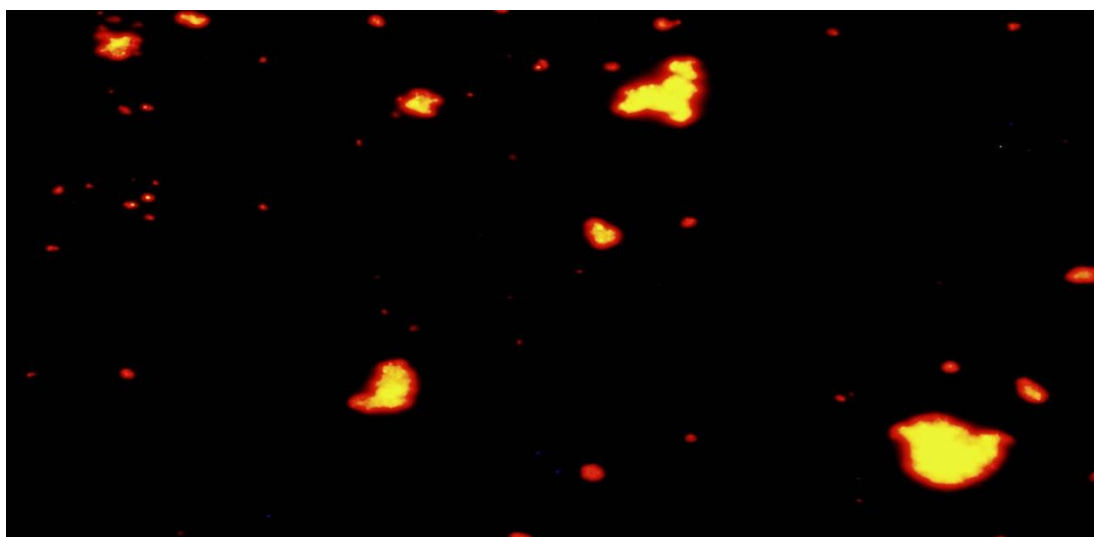
### **7.3 Sledování shluků nanočástic ve vzorcích fluorescenčním mikroskopem**

Vzorky disperzí nanočástic s vytvořenými agregáty byly změřeny přístrojem DLS a vzápětí byly vytvořeny mikroskopické preparáty (viz **oddíl 6.3.9**). Fluorescenčním mikroskopem byly sledovány a fotodokumentovány shluky částic vzorku D v neředěných fosfátových pufrech dle Sørensenů o pH 6,6 a 7,4. Velikost aglomerátů byla zjištěna přirovnáváním k měřítku fotografie, což umožňoval program AnalySIS Auto, a pohybovala se v rozptylu od  $0,6\ \mu\text{m}$  do  $18,5\ \mu\text{m}$ . Dokladem nalezených aglomerátů jsou **obrázky 5 – 8**.

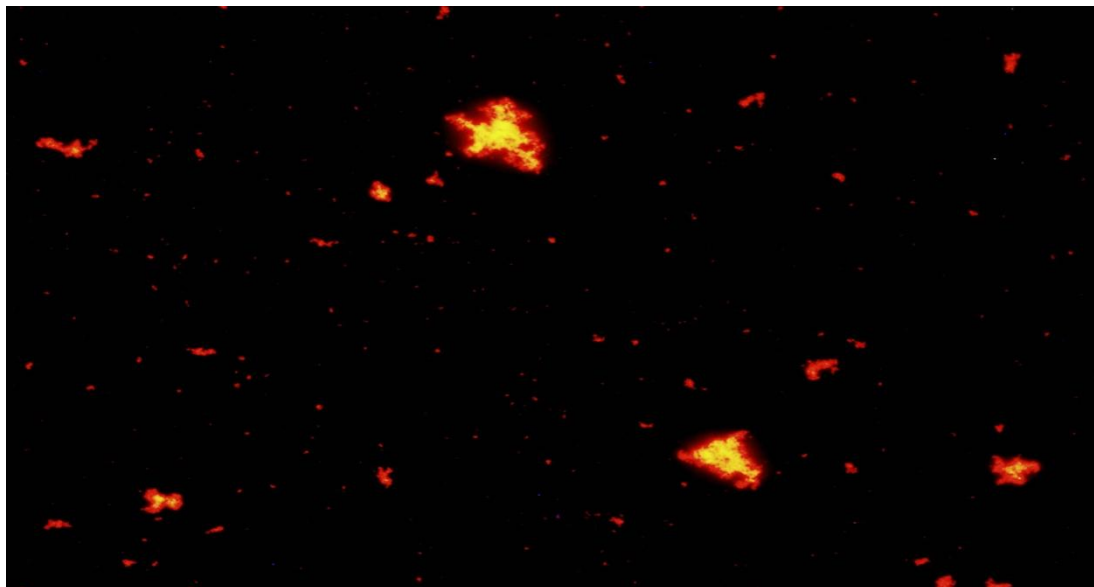
**Obr. 5** – Nanočástice vzorku D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 6,6; nastavení mikroskopu: filtr WIB, 2000 ms, ISO 400, zvětšení 100x (zde byly nalezeny jedny z největších shluků, jejich velikost dosahovala až 18,5  $\mu\text{m}$ )



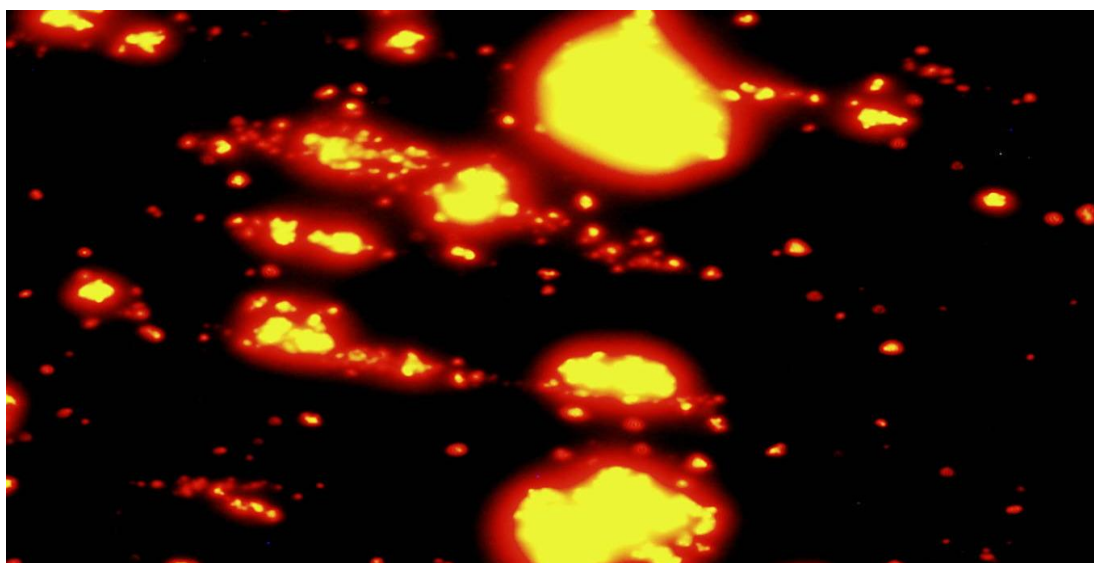
**Obr. 6** – Nanočástice vzorku D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 6,6; nastavení mikroskopu: filtr WIB, 2000 ms, ISO 400, zvětšení 100x



**Obr. 7** – Nanočástice vzorku D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 7,4; nastavení mikroskopu: filtr WIB, 2000 ms, ISO 400, zvětšení 100x



**Obr. 8** – Nanočástice vzorku D (Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 7,4; nastavení mikroskopu: filtr WIB, 2000 ms, ISO 400, zvětšení 100x (obrázek dokumentuje více vrstev aglomerátů nanočástic, zobrazujících se postupným proostřováním obrazu)

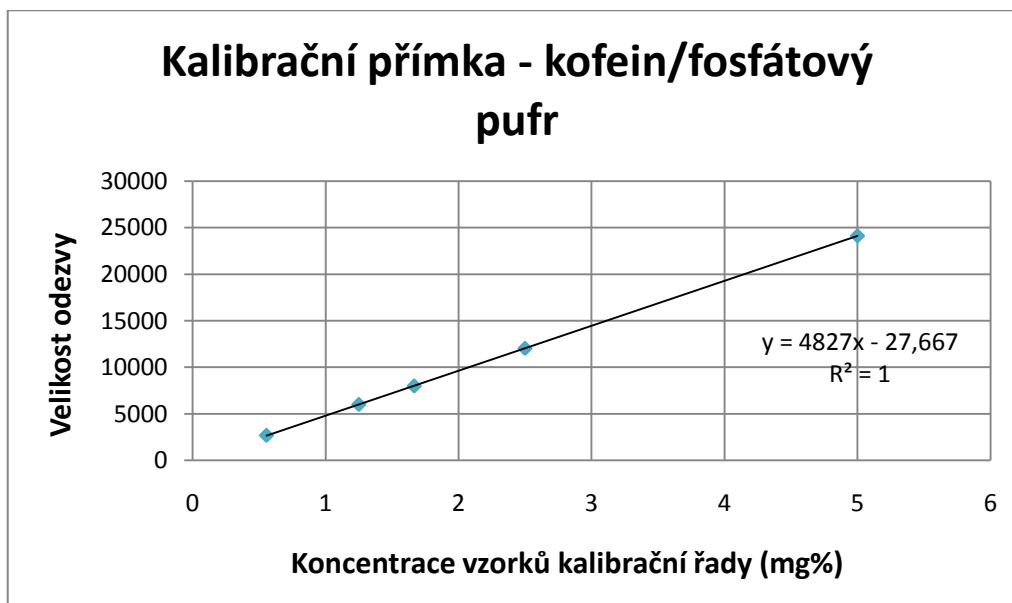


## 7.4 Kalibrační přímky

Kalibrační přímky pro stanovení koncentrace nanočástic v odebíraných vzorcích byly sestaveny metodou lineární regrese z hodnot naměřených pomocí HPLC přístroje.

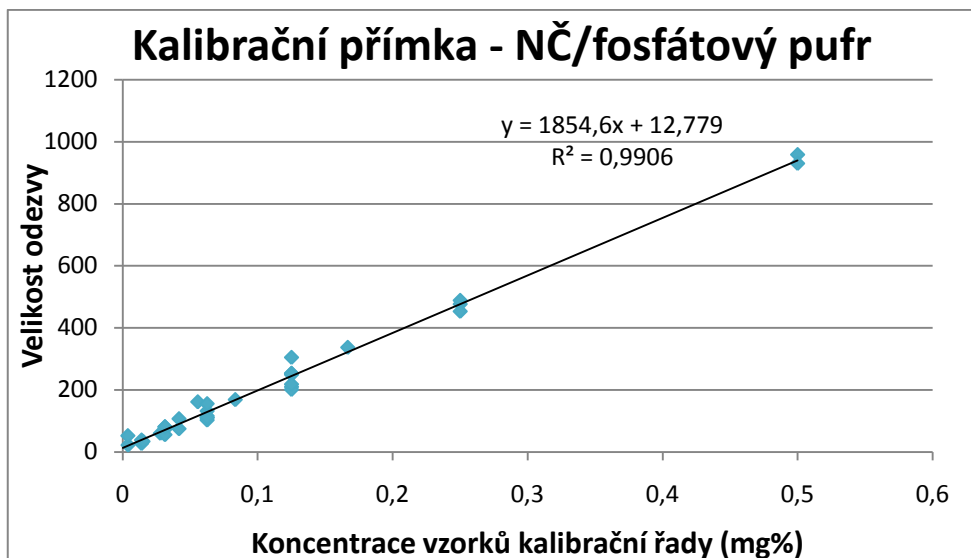
**Graf 1 a 2** zobrazuje samotné kalibrační, vyčíslení rovnic a informace statistického koeficientu determinace  $R^2$  pro kofein a nanočástice ve fosfátovém pufru. Způsob přípravy vzorků kalibrační řady popisuje **oddíl 6.3.7**.

Takto získaná data nám deklarují, že zvolená analytická metoda vyhovovala požadavkům na rychlé a citlivé stanovení koncentrace nanočástic prošlých do akceptorové fáze.



**Graf 1** – Kalibrační přímka pro kofein





**Graf 2** – Kalibrační přímka pro nanočástice

## 7.5 Vyhodnocení permeačních pokusů

Kolegyně Michaela Šašurová se ve své diplomové práci zabývala zkoumáním technik zpracování sublingválních membrán a technikami fixace sublingválních membrán v modifikovaných Franzových difúzních celách. Předmětem mého zájmu bylo porovnání rozdílů průniku nanočástic dispergovaných ve fosfátovém a citrátovém pufru přes sublingvální membránu.

Za tímto účelem byl při permeačních pokusech zkoumán průnik nanočástic a kofeinu přes membránu z fáze donorové do fáze akceptorové, z které se pomocí HPLC určilo množství prošlých nanočástic. Fází donorovou byl fosfátový pufr o pH 6,6 ředěný 1:9 a pufr citrátový o pH 6,6 také ředěný 1:9. Akceptorovým médiem byl pufr fosfátový o pH 7,4 ředěný 1:9. Na tento podnět byly vytvořeny dvě kalibrační přímky, jedna pro kofein ve fosfátovém pufru a druhá pro nanočástice ve fosfátovém pufru. Kalibrační přímka s citrátovým pufrem sestrojována nebyla, protože akceptorovou fází tvořil pouze pufr fosfátový.

### 7.5.1 Srovnání vlivu donorových fází na přechod nanočástic přes sublingvální membránu

Výsledky byly vyhodnoceny na základě údajů  $Q_t$  (exp) získaných analýzou vzorků HPLC a jejich následnou úpravou v šabloně pro zpracování výsledků permeací.

Údaje  $Q_t$  (exp) ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) vyjadřují množství permeantu prošlého přes sublingvální membránu o ploše  $1\text{ cm}^2$  do akceptorového média. Tato data byla pro zjednodušení převedena na hodnoty poměrové veličiny **R** (%). Hodnota **R** určuje poměr hodnoty  $Q_t$  (exp) v jednotlivých časech odběru k maximálnímu zaznamenanému množství proniklých částic.

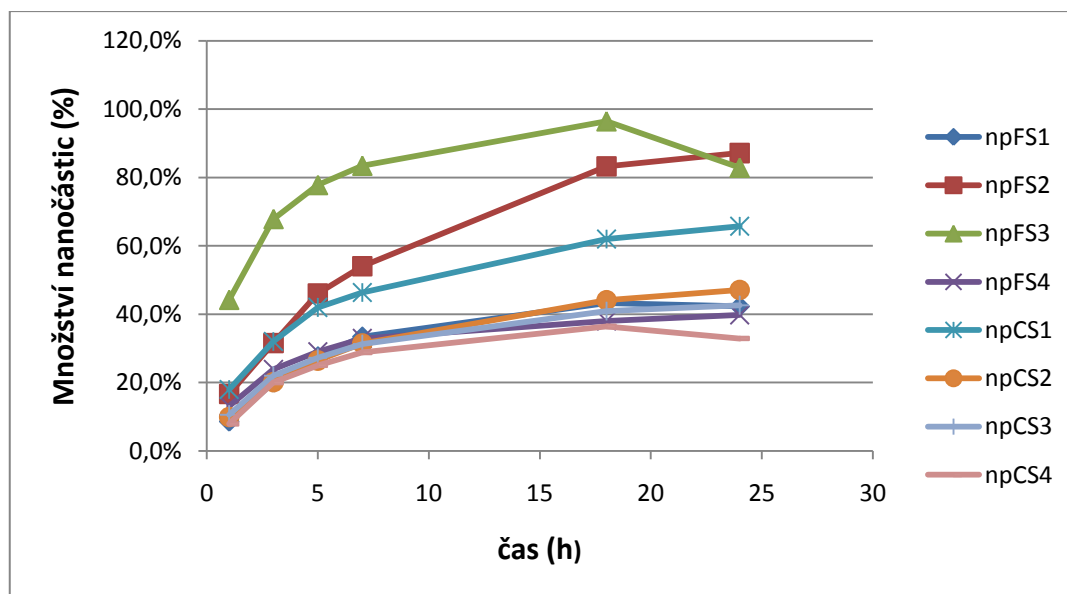
**Tabulka 21** uvádí hodnoty **R** v jednotlivých časech odběru permeačního pokusu P1, což dokladuje **Graf 3**. V **tabulce 22** a **Grafu 5** jsou tytéž hodnoty pro permeační pokus P2. V pokusu P1 bylo pracováno s dlouhodobě zmraženými prasečími sublingválními membránami a v pokusu P2 se pracovalo s membránami čerstvými. V permeacích P1 i P2 donorovou fází v celách č. 1 – 4 tvořil fosfátový pufr o pH 6,6 a v celách č. 5 – 8 citrátový pufr o pH 6,6. Membrány byly fixovány silikonem.

### 7.5.1.1 Permeační pokus P1

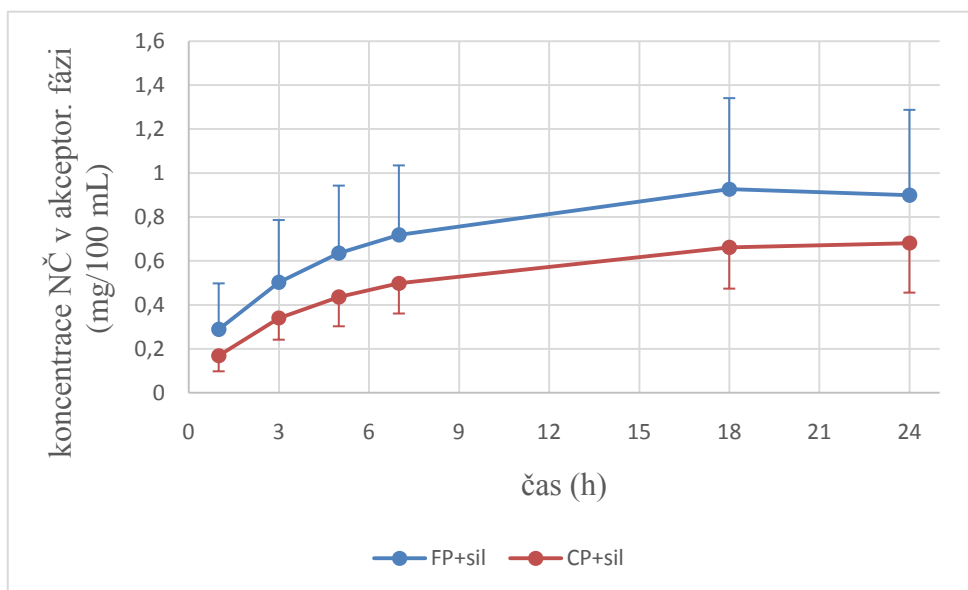
**Tabulka 21** - Tabulka hodnot R (%) pro permeaci P1; cely 1 – 4 – fosfátový pufr, cely 5 – 8 – citrátový pufr

Cela	Čas odběru akceptorové fáze (hod)					
	1	3	5	7	18	24
1	19,9	46,3	63,8	77,2	100,0	97,8
2	19,1	36,2	52,8	62,0	95,5	100,0
3	45,8	70,4	80,7	86,5	100,0	85,9
4	33,0	60,1	72,9	82,7	95,6	100,0
5	27,3	48,8	63,9	70,5	94,2	100,0
6	21,1	42,7	56,2	66,7	93,6	100,0
7	24,9	51,6	63,9	73,4	96,0	100,0
8	21,8	54,9	68,7	79,1	100,0	90,3

**Graf 3** – Množství permeovaných nanočástic (%) v čase při permeaci P1



**Graf 4** - Časové průběhy koncentrací (mg/100 ml) permeovaných nanočástic v pokusu P1 s chybovými úsečkami



V **Grafu 3** je zobrazeno normalizované procentuální zastoupení nanočástic v akceptorové fázi v jednotlivých časech odběru. Křivky npFS1 – npFS4 představují množství proniklých nanočástic v celách 1 – 4, kde donorovou fází představoval fosfátový pufr, křivky npCS1 – npCS4 značí množství prošlých nanočástic v celách 5 – 8, kde donorovým médiem byl citrátový pufr.

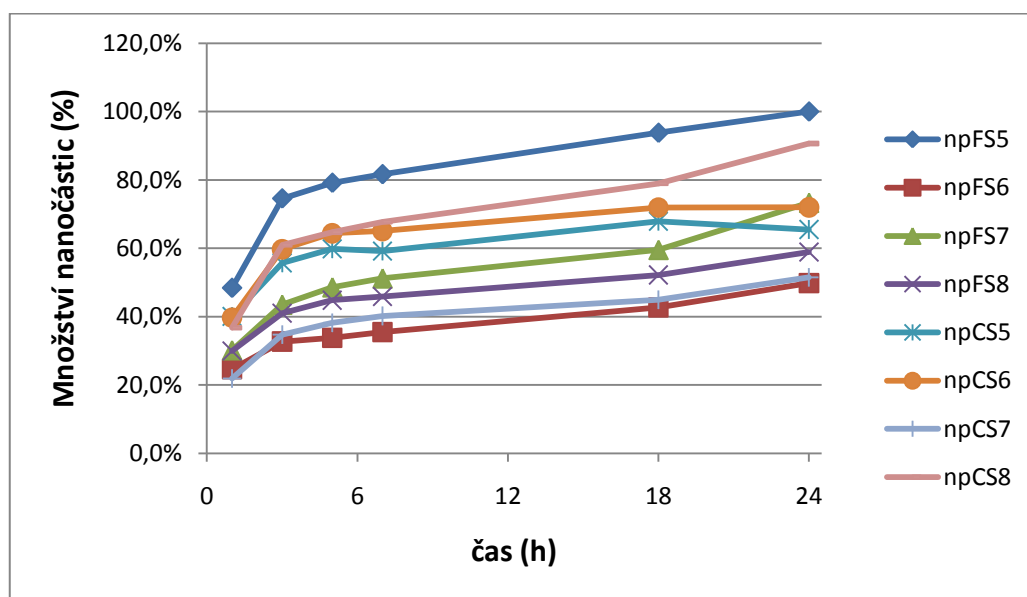
Přehled srovnání průchodu nanočástic membránami z fosfátových a citrátových pufrů v průběhu permeace P1 prezentuje **Graf 4**, jež vychází z průměrných hodnot koncentrací nanočástic proniklých do akceptorové fáze v jednotlivých časech odběru. Křivka FP+sil zobrazuje průměrné hodnoty koncentrací NČ v akceptorové fázi z cel s fosfátovým pufrem, křivka CP+sil zobrazuje hodnoty koncentrací NČ v akceptoru z cel s citrátovým pufrem.

### 7.5.1.2 Permeační pokus P2

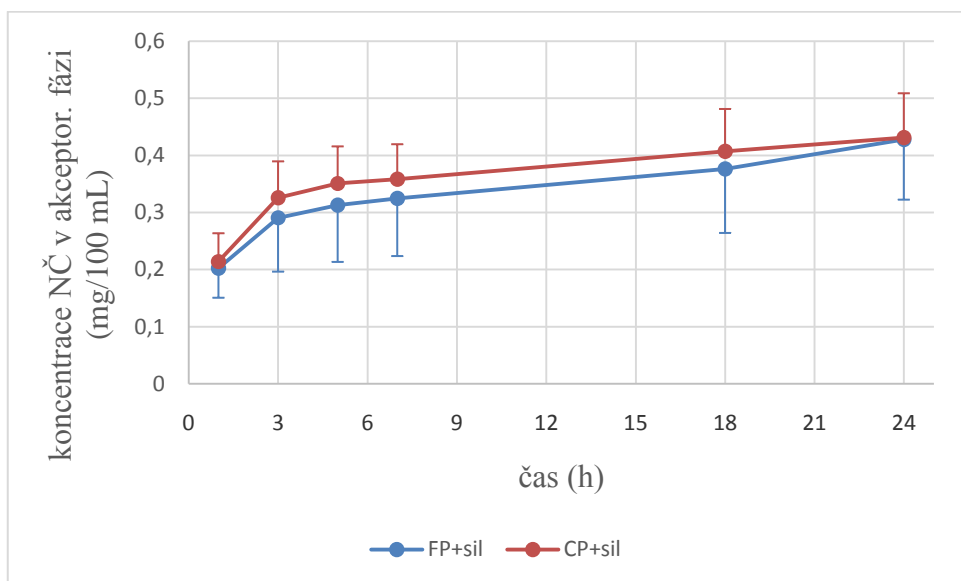
**Tabulka 22** - Tabulka hodnot R (%) pro permeaci P2; cely 1 – 4 – fosfátový pufr, cely 5 – 8 – citrátový pufr

Cela	Čas odběru akceptorové fáze (hod)					
	1	3	5	7	18	24
1	48,4	74,6	79,2	81,7	93,8	100,0
2	49,5	65,7	67,9	71,2	85,8	100,0
3	41,1	59,3	66,2	69,8	81,2	100,0
4	50,9	69,5	76,0	77,9	88,6	100,0
5	59,0	82,0	88,2	87,1	100,0	96,5
6	55,2	83,0	89,5	90,4	99,9	100,0
7	42,5	67,4	74,1	78,0	87,2	100,0
8	40,5	67,3	71,4	74,7	87,1	100,0

**Graf 5** - Množství permeovaných nanočástic (%) v čase při permeaci P2



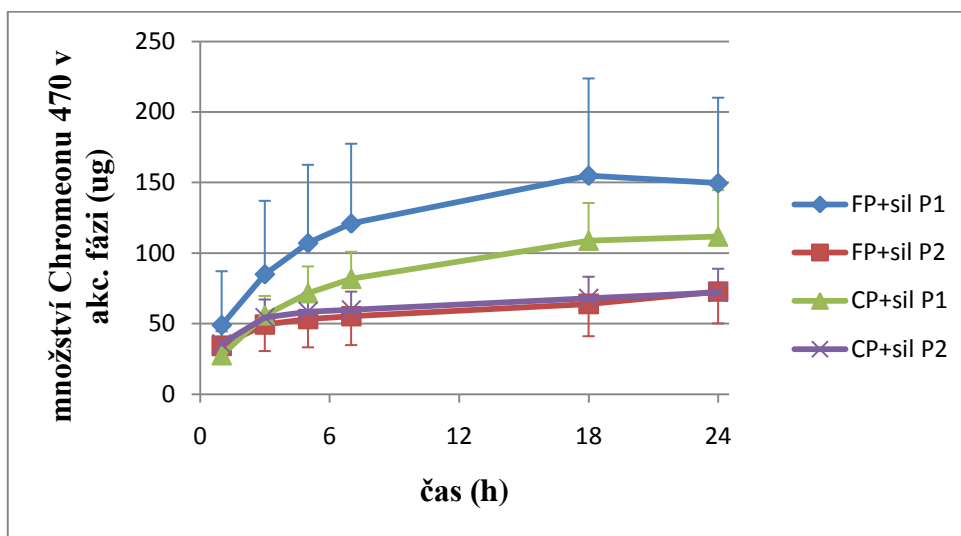
**Graf 6** – Časové průběhy koncentrací (mg/100 ml) permeovaných nanočástic v pokusu P2 s chybovými úsečkami



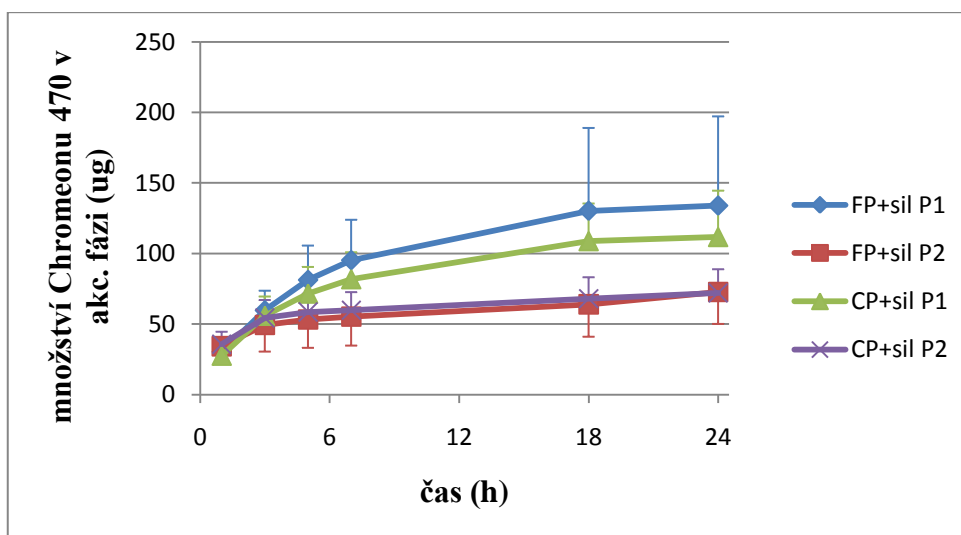
**Graf 5** představuje normalizované procentuální zastoupení nanočástic v akceptorové fázi v jednotlivých časech odběru. Křivky npFS5 – npFS8 představují množství proniklých nanočástic v celách 1 – 4, kde donorovou fází představoval fosfátový pufr, křivky npCS5 – npCS8 značí množství prošlých nanočástic v celách 5 – 8, kde donorovým médiem byl citrátový pufr.

V **Grafu 6** nám křivka označená FP+sil udává průměrné hodnoty koncentrací nanočástic v akceptorové fázi z cel s fosfátovým pufrem, křivka CP+sil udává průměrné hodnoty koncentrací nanočástic v akceptorové fázi z cel s citrátovým pufrem.

**Graf 7** – Vliv použité donorové fáze při průniku nanočástic zmraženou a nativní sublingvální membránou.



**Graf 8** – Vliv použité donorové fáze při průniku nanočástic zmraženou a nativní sublingvální membránou. Srovnání permeace P1 a P2 (po vyřazení vzorku npFS3).



Konečné porovnání vlivu použité donorové fáze na množství nanočástic prošlých přes dlouhodobě zmraženou a čerstvou prasečí sublingvální membránu do

akceptorového média uvádí **Graf 7**. **Graf 8** nám taktéž srovnává permeace P1 a P2 s tím rozdílem, že byl vyloučen vzorek npFS3, u kterého byl přestup nanočástic do média podezřele vysoký. Důvod tohoto jevu nám není zcela jasný, je možné že sublingvální membrána použitá v této cele byla slabší nebo měla větší permeační prostory. Vzorek npFS3 jsme si dovolili vyřadit, protože rozdíly v permeacích nejsou příliš statisticky významné.

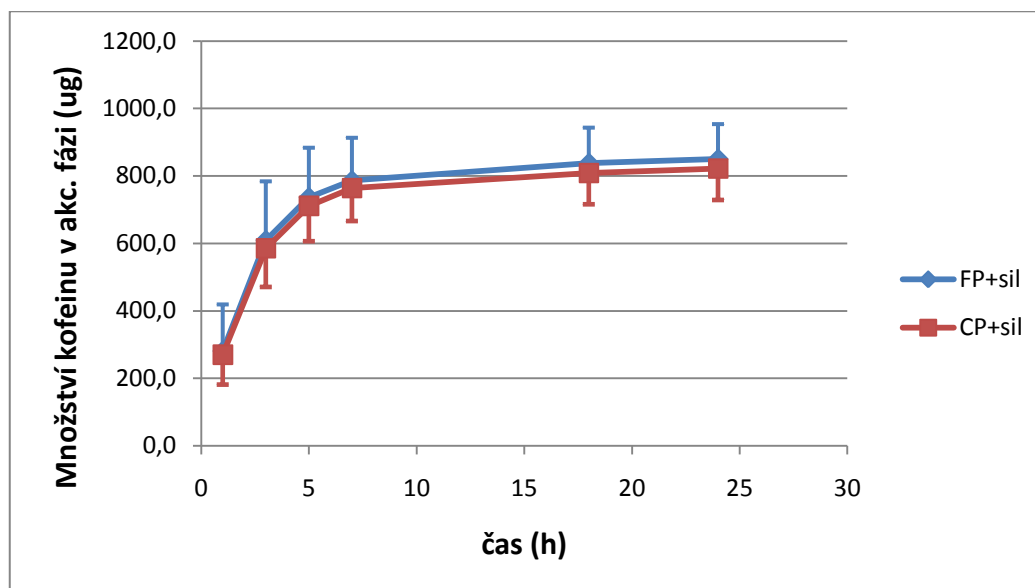
Pufry jsou konjugované kyseliny a báze, mající za úkol udržovat systém ve stabilním rozmezí pH. Fosfátové pufry jsou používány k simulaci vnitřního prostředí organismu nejčastěji. Tato práce porovnává vliv přechodu nanočástic z pufru fosfátového a pufru citrát-uhličitanového, který je dalším fyziologicky akceptabilním pufrem, jehož složení udává dispergovaným částicím výrazně jinak uspořádanou hydrosféru, tudíž předpoklad jiných agregačních a permeačních vlastností. Teorii stability heterogenních koloidně-disperzních soustav s vodným disperzním prostředím popisuje DLVO teorie. Experimentální pokusy ukázaly, že vliv obou pufrů při permeaci je téměř srovnatelný.<sup>31,32</sup>

**Grafy 5,6 a 7** udávají koncentrace nanočástic prošlých do akceptorové fáze, z čehož zle vyvodit fakt, že nanočástice snázeji přecházejí skrz zmrazenou membránu než přes membránu čerstvě vypreparovanou, naloženou do fyziologického roztoku. Ke stejnému závěru došli po provedení experimentálních pokusů ve svých dřívějších diplomových pracích i Pavlína Dvořáková a Martina Spurná.

Pro kompletnost hodnocení je uveden **Graf 9** uvádějící průchod kofeinu jako markeru membránové integrity do akceptorové fáze. Graf byl vytvořen z průměrných hodnot  $Q_t$  ( $_{exp}$ ) získaných analýzou akceptorové fáze z jednotlivých cel v průběhu pokusů P1 a P2. Průnik kofeinu přes sublingvální membránu volba donorového pufru příliš neovlivňuje.



**Graf 9** – Vliv volby donorové fáze na průnik kofeinu sublingvální membránou.

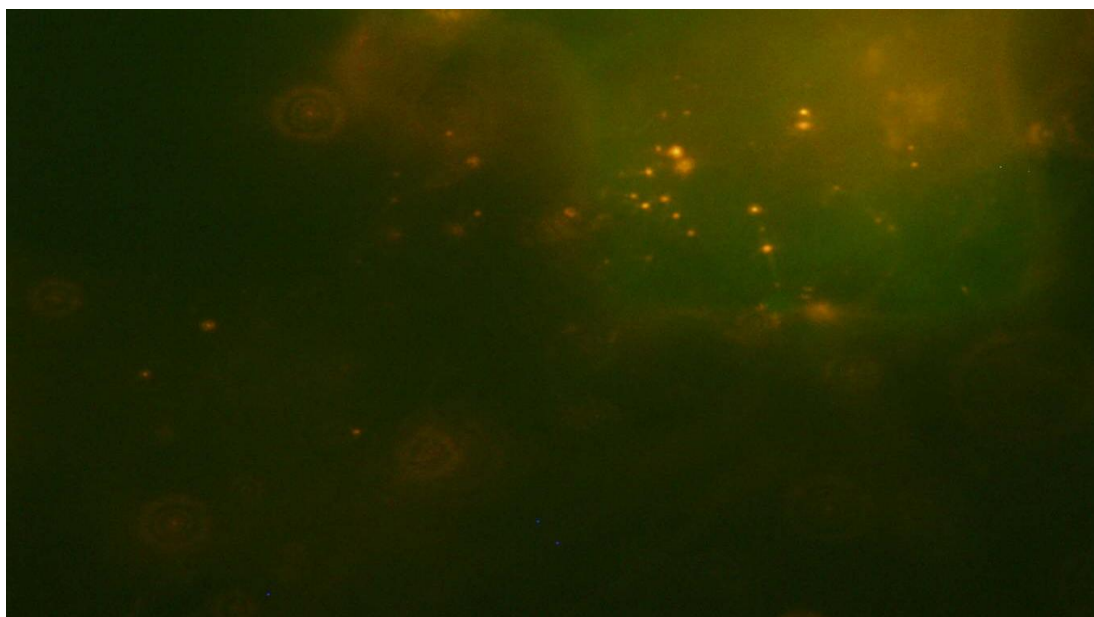


## **7.6 Fotodokumentace z fluorescenční mikroskopie sublingválních membrán**

V závěru této práce bylo naším zájmem ověřit pomocí fluorescenčního mikroskopu, že nanočástice přes sublingvální membránu procházejí, jak jsou na membráně rozprostřeny a zda se nechá najít rozdíl v průniku nanočástic do akceptorového média při různé volbě donorové fáze (fosfátový pufr o pH 6,6 ředěný 1:9, citrátový pufr o pH 6,6 ředěný 1:9).

Z důvodu časové náročnosti samotného mikroskopování byly nahodile zvoleny preparáty, které reprezentovaly různé kombinace použitých membrán a voleb donorové fáze. Zkoumány byly membrány dlouhodobě zmrazené i čerstvě vypreparované s různou donorovou fází. Prohlédnuta byla vždy donorová i akceptorová strana membrány. Přípravu preparátu pro fluorescenční mikroskopii nám popisuje **oddíl 6.3.9**.

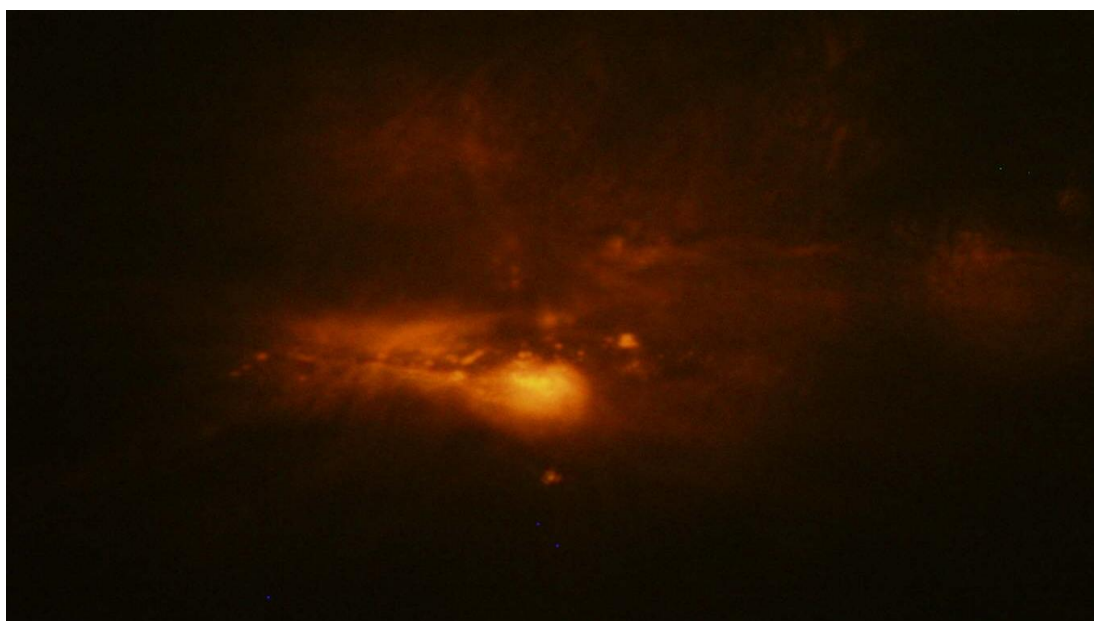
**Obr. 9** - Zmrazená sublingvální membrána, fosfátový pufr, donorová strana, střed preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 2000 ms, ISO 800, zvětšení 100x, zdroj VIS



**Obr. 10** - Zmrazená sublingvální membrána, fosfátový pufr, akceptorová strana, střed preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 2000 ms, ISO 800, zvětšení 100x, zdroj VIS



**Obr. 11** - Zmrazená sublingvální membrána, citrátový pufr, donorová strana, střed preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 1500 ms, ISO 800, zvětšení 100x, zdroj VIS



**Obr. 12** - Zmrazená sublingvální membrána, citrátový pufr, akceptorová strana, střed preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 1500 ms, ISO 1600, zvětšení 100x, zdroj VIS



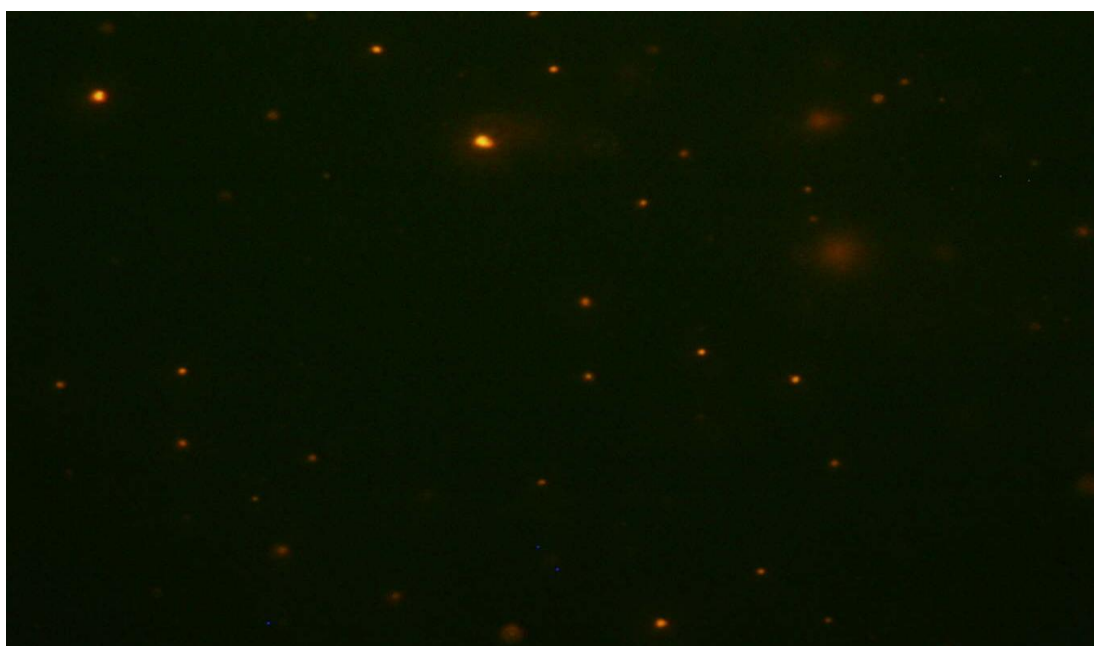
**Obr. 13** - Nativní sublingvální membrána, fosfátový pufr, donorová strana, okraj preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 2000 ms, ISO 800, zvětšení 100x, zdroj VIS



**Obr. 14** - Nativní sublingvální membrána, fosfátový pufr, akceptorová strana, okraj preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 2000 ms, ISO 1600, zvětšení 100x, zdroj VIS



**Obr. 15** - Nativní sublingvální membrána, citrátový pufr, donorová strana, okraj preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 1500 ms, ISO 800, zvětšení 100x, zdroj VIS





**Obr. 16** - Nativní sublingvální membrána, citrátový pufr, akceptorová strana, okraj preparátu; nastavení mikroskopu – WIB, 1500 ms, ISO 1600, zvětšení 100x, zdroj VIS



Na donorové straně zmrazené i nativní membrány bylo snadné najít velké množství nanočástic, což dokladuje **Obr. 9,11,13 a 15**. Proostřováním obrazu se dalo najít mnoho fluoreskujících částic v různých vrstvách membrány, tak jak se v ní zachytávaly při permeaci.

Hledání fluoreskujících nanočástic na akceptorové straně zmrazené i čerstvé membrány bylo významně složitější. Částice se zde nenacházely v tak vysoké koncentraci jako na straně donorové a bylo možno je sledovat, jako samostatné fluoreskující body viz **Obr. 10, 12, 14 a 16**.

Závěrem je nutno dodat, že fluoreskující nanočástice se nacházely u zmrazených i nativních membrán (u fosfátového i citrátového donorového média) a to z jejich donorové i akceptorové strany, ve středních částech i po okrajích preparátů. Membrány byly celistvé a neproděravěné, možná jen v Obr. 8 se nachází ztenčené světlé místo membrány.

## 8 Závěry

1. Průměrná hodnota **pH** disperzí nanočástic A,B,D,E a F je  **$6,7 \pm 0,1095$**
2. Metodou DLS bylo zjištěno, že vzorek D karboxylovaných nanočástic PD značených Chromeonem 470 vytváří po dispergaci ve fosfátových pufrách o pH 6,6 a o pH 7,4 aglomeráty. V čištěné vodě tomu tak nebylo. Aglomeráty byly vytvořeny také v karboxylovaném vzorku F založeném na polymeru PD, značeném Chromeonem 454 dispergovaném v týchž fosfátových pufrách. Po dispergaci tohoto vzorku v čištěné vodě shluky vytvořeny nebyly.
3. Aglomeráty vzniklé ve fosfátových pufrách bylo možné sledovat fluorescenčním mikroskopem. Desintegrace těchto shluků byla provedena zředěním fosfátových pufrů čištěnou vodou v poměru 1:9.
4. Nanočástice založené na polymeru PD značené Chromeonem 470 prochází sublingvální membránou.
5. Nanočástice přecházejí snáze přes dlouhodobě zmrazenou sublingvální membránu než přes membránu čerstvě vypreparovanou.
6. Nanočástice bylo možné fluorescenčním mikroskopem pozorovat jako svítící tečky na donorové i akceptorové straně membrány.
7. Volba donorové fáze, ať už fosfátové nebo citrátové, nemá statisticky významný vliv na přechod nanočástic přes sublingvální membránu.

Tvorba aglomerátů disperzí nanočástic v citrátovém pufru měřena metodou DLS nebyla, nicméně protože nanočástice permeují z fosfátového a citrátového pufru téměř srovnatelně, lze vyvodit závěrem, že v citrátovém pufru se aglomeráty nanočástic netvoří.

Pro budoucí experimenty tohoto typu bych doporučila provést více sérií měření s větším množstvím vzorků a věnovat větší pozornost donorovým médiím, zejména citrátovému pufru.

## 9 Použitá literatura

- 1 Čihák, R.; Grim, M. *Anatomie 2*, 2nd-ed.; Grada: Praha, CZ, 2002; s. 33 – 39.
- 2 Trojan, S.; Langmeier, M.; et al. *Lékařská fyziologie*, 4th-ed.; Grada: Praha, CZ, 2003; s. 231 – 327.
- 3 Silbernagl, Stefan a Despopoulos, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka*. Praha : Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
- 4 LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1
- 5 LINCOVÁ, Dagmar, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Základní a aplikovaná farmakologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. 1. vyd. Editor Hassan Farghali. Praha: Galén, 2002, xxiv, 601 s. ISBN 80-246-0538-4
- 6 DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika* [online]. grada publishing [cit. 2014-09-09], s. 69-70
- 7  
[Http://www.wikiskripta.eu/index.php/P%C5%99%C3%ADvodn%C3%AD\\_esty\\_1%C3%A9%C4%8Diva\\_do\\_organismu](http://www.wikiskripta.eu/index.php/P%C5%99%C3%ADvodn%C3%AD_esty_1%C3%A9%C4%8Diva_do_organismu). [online]. [cit. 2014-05-10]
- 8 Martínková, J.; et al. *Farmakologie: pro studenty zdravotnických oborů*; Grada: Praha, CZ, 2007; s. 34 - 38
- 9 [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z:<http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>
- 10 Dunn S., Singh K. A.: Analysis of M-Level modules in Interdisciplinary Nanotechnology Education in Europe (2009) Institute of Nanotechnology, Glasgow.
- 11 [Http://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/nanotech.pdf](http://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/nanotech.pdf). [online]. [cit. 2014-04-14].



- 12 [HTTP://WWW.PA.MSU.EDU/~YANG/RFEYNMAN\\_PLENTYSPACE.PDF](http://www.pa.msu.edu/~yang/rfeynman_plentyspace.pdf).  
[online]. [cit. 2014-05-12].
- 13 LAI, Patrick, Weiam DAEAR, Raimar LÖBENBERG a Elmar J. PRENNER. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, vol. 118, s. 154-163 [cit. 2014-09-09].
- 14 VIZIRIANAKIS, Ioannis S., Weiam DAEAR, Raimar LÖBENBERG a Elmar J. PRENNER. Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2011, vol. 7, issue 1, s. 11-17 [cit. 2014-09-09].
- 15 RABIŠKOVÁ, Miloslava. Remedial. *Nanočástice pro léčivé formy*. s. 495-500.
- 16 [Http://www.sigmaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=15933803](http://www.sigmaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=15933803). [online]. [cit. 2014-09-10].
- 17 [Http://www.foresight.org/nano/whatisnano.html](http://www.foresight.org/nano/whatisnano.html). [online]. [cit. 2014-04-14].
- 18 [Http://nanotechnologie.vsb.cz/](http://nanotechnologie.vsb.cz/). [online]. [cit. 2014-04-03].
- 19 BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- 20 [Http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/](http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/). [online]. [cit. 2014-09-10]
- 21 [Http://www.chempoint.cz/fluorescenci-mikroskopie](http://www.chempoint.cz/fluorescenci-mikroskopie).  
[HTTP://WWW.CHEMPOINT.CZ/FLUORESCENCNI-MIKROSKOPIE](http://www.chempoint.cz/fluorescenci-mikroskopie).  
[online]. [cit. 2014-09-10].
- 22 [Http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/](http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/). [online]. [cit. 2014-09-10].

- 23 [Http://vr-](http://vr-core.wustl.edu/Pages/Olympus_BX51_fluorescence_microscope.aspx)  
core.wustl.edu/Pages/Olympus\_BX51\_fluorescence\_microscope.aspx.  
[online]. [cit. 2014-09-10]
- 24 [Http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-](http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx?gclid=CMTo99DX1sACFaoSwwodFSAAgQ)  
scattering/default.aspx?gclid=CMTo99DX1sACFaoSwwodFSAAgQ [online].  
[cit. 2014-09-10].
- 25 [Http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=2720](http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=2720) [online]. [cit. 2014-09-10].
- 26 [Http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-](http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity)  
viskozity [online]. [cit. 2014-09-10].
- 27  
[Https://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics\\_173\\_273/dynamic\\_lig](https://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf)  
ht\_scattering\_03.pdf. In: [online]. [cit. 2014-09-10].
- 28 KOPECKÝ, František. INCLUSION COMPLEXATION OF  
CARBETHOPENDECINIUM BROMIDE WITH SOME  $\alpha$ - AND  $\beta$ -  
CYCLODEXTRINS STUDIED BY POTENTIOMETRY WITH  
MEMBRANE ELECTRODES. s. 384 – 396
- 29 VOJTEKOVA, Maria a Frantisek KOPECKY. EFFECT OF ADDITION OF  
KX TYPE ELECTROLYTES AND TEMPERATURE ON THE CRITICAL  
MICELLAR CONCENTRATIONS OF 1-CETYLPYRIDINIUM AND  
CARBETHOPENDECINIUM BROMIDES. s. 99 – 105
- 30 NIZRI, G., A. MAKARSKY, S. MAGDASSI a Y. TALMON.  
Nanostructures Formed by Self-Assembly of Negatively Charged Polymer  
and Cationic Surfactants. *Langmuir* [online]. 2009-02-17, vol. 25, issue 4, s.  
1980-1985 [cit. 2014-09-08].
- 31 [Https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf](https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf) [online].  
[cit. 2014-08-11].
- 32 [Http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/teorie\\_dlvo.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/teorie_dlvo.html).  
[online]. [cit. 2014-08-11].

- 33 Ashady, R.; Smart nano- and microparticles. London; s. 417. Citováno podle:  
Rabišková, M. Nanočástice pro léčivé formy. Remedica 2007; s. 495 - 501

## 10 Seznam použitých zkratek

<b>P1 a P2</b>	první a druhý permeační pokus
<b>C<sub>k</sub> (mg/100ml)</b>	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>C<sub>k</sub> (mg/100ml)</b>	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>J (μg.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	flux nanočástic
<b>V<sub>o</sub>(ml)</b>	celkové množství akceptorového média
<b>ΔV<sub>dop</sub> (ml)</b>	množství doplňované akceptorového média
<b>t (h)</b>	čas
<b>Q<sub>t</sub> (μg/cm<sup>2</sup>)</b>	množství permeantu prošlého přes 1cm <sup>2</sup> sublingvální membrány
<b>R (%)</b>	poměr množství permeantu prošlého membránou v určitém čase k maximálnímu prošlému množství permeantu
<b>q</b>	absolutní člen
<b>r</b>	korelační koeficient
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>n</b>	počet naměřených bodů
<b>PdI</b>	index polydisperzity
<b>NČ</b>	nanočástice
<b>Mr (g/mol)</b>	molekulová hmotnost
<b>pH</b>	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
<b>DLS</b>	dynamický rozptyl světla
<b>ISO</b>	citlivost – fluorescenční mikroskop
<b>PTFE</b>	polytetrafluorethylen
<b>VIS</b>	viditelné světlo
<b>WIB</b>	filtr – fluorescenční mikroskop

<b>FP</b>	fosfátový pufr
<b>CP</b>	citrátový pufr
<b>sil</b>	membrána fixována silikonem

# 11 Přílohy

## Protokol P1-1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,9$

Jazyk: npFS1

Donor: FP+sil

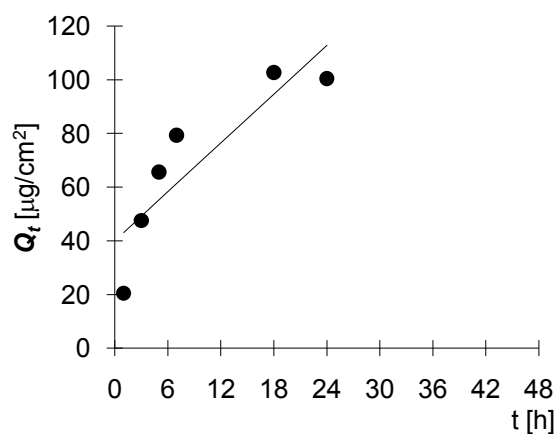
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,114	1	0,114	20,5	20,5
3	0,259	1	0,266	47,6	47,6
5	0,346	1	0,366	65,6	65,6
7	0,403	1	0,443	79,3	79,3
18	0,511	1	0,574	102,7	102,7
24	0,470	0	0,561	100,5	100,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	20,5	43,1
3	47,6	49,2
5	65,6	55,2
7	79,3	61,3
18	102,7	94,6
24	100,5	112,8

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 3,032148$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 40,05633$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,877134$	



## Protokol P1-2

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,4$

Jazyk: npFS2

Donor: FP+sil

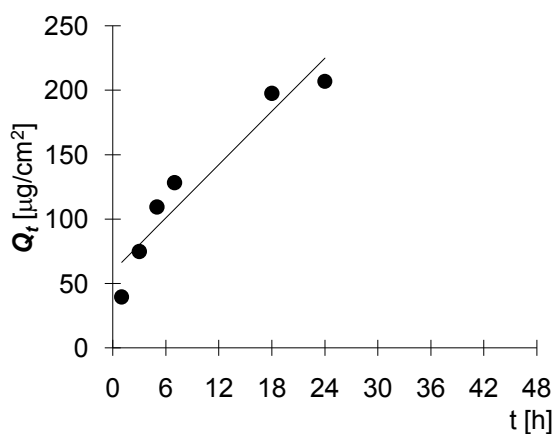
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,257	1	0,257	39,5	39,5
3	0,470	1	0,486	74,9	74,9
5	0,663	1	0,710	109,3	109,3
7	0,743	1	0,833	128,3	128,3
18	1,145	1	1,283	197,7	197,7
24	1,131	0	1,343	206,9	206,9

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	39,5	66,4
3	74,9	80,1
5	109,3	93,9
7	128,3	107,7
18	197,7	183,5
24	206,9	224,9

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 6,893183$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 59,46426$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,955133$	



## Protokol P1-3

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,8$

Jazyk: npFS3

Donor: FP+sil

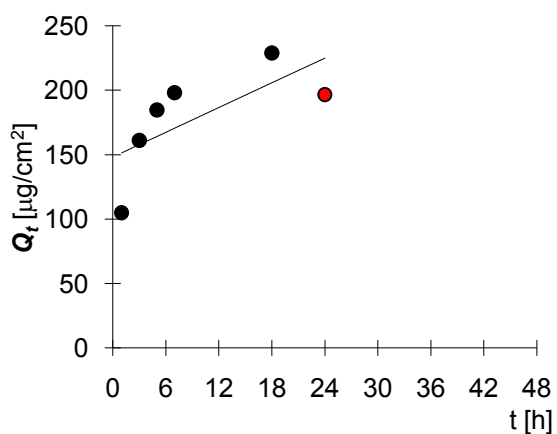
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,589	1	0,589	104,9	104,9
3	0,872	1	0,905	161,0	161,0
5	0,955	1	1,037	184,6	184,6
7	0,977	1	1,113	198,0	198,0
18	1,095	1	1,286	228,9	228,9
24	0,853	0	1,105	196,7	196,7

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	104,9	151,3
3	161,0	157,7
5	184,6	164,1
7	198,0	170,5
18	228,9	205,7
24	196,7	224,9

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 3,19797$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 148,1098$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,693301$	





## Protokol P1-4

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,1$

Jazyk: npFS4

Donor: FP+sil

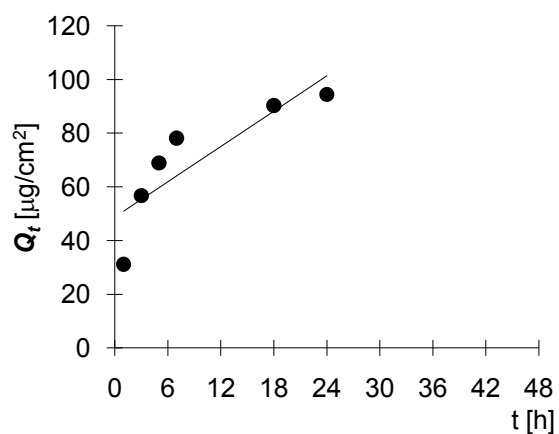
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,194	1	0,194	31,2	31,2
3	0,340	1	0,352	56,7	56,7
5	0,395	1	0,428	68,9	68,9
7	0,427	1	0,485	78,1	78,1
18	0,477	1	0,561	90,3	90,3
24	0,473	0	0,587	94,4	94,4

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	31,2	50,9
3	56,7	55,3
5	68,9	59,7
7	78,1	64,1
18	90,3	88,2
24	94,4	101,4

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 2,192771$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 48,74075$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,85851$	



## Protokol P1-5

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,8$

Jazyk: npCS1

Donor: CP+sil

Měření: P1

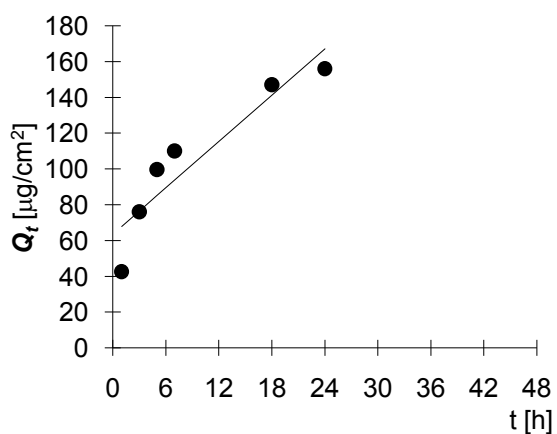
Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,270	1	0,270	42,7	42,7
3	0,465	1	0,482	76,1	76,1
5	0,585	1	0,631	99,7	99,7
7	0,613	1	0,697	110,1	110,1
18	0,809	1	0,931	147,1	147,1
24	0,814	0	0,988	156,1	156,1

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	42,7	67,9
3	76,1	76,5
5	99,7	85,1
7	110,1	93,8
18	147,1	141,2
24	156,1	167,1

### Parametry regrese

Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 4,315554$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 63,56522$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,928032$	



## Protokol P1-6

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,5$

Jazyk: npCS2

Donor: CP+sil

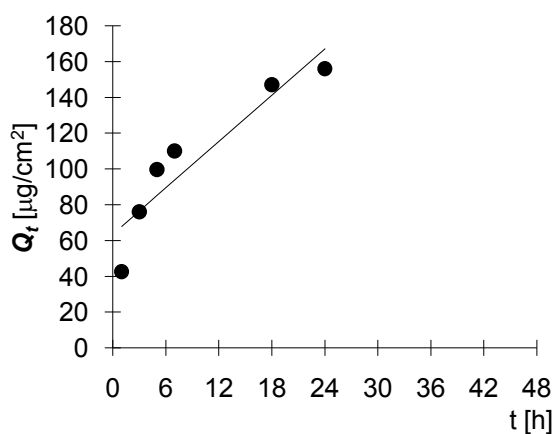
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,135	1	0,135	23,6	23,6
3	0,265	1	0,273	47,7	47,7
5	0,336	1	0,359	62,8	62,8
7	0,384	1	0,427	74,6	74,6
18	0,534	1	0,598	104,7	104,7
24	0,545	0	0,639	111,9	111,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	42,7	67,9
3	76,1	76,5
5	99,7	85,1
7	110,1	93,8
18	147,1	141,2
24	156,1	167,1

Parametry regrese		
Počet bodů	n = 6	
Flux	J = 4,315554	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	q = 63,56522	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	r = 0,928032	



## Protokol P1-7

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,5$

Jazyk: npCS3

Donor: CP+sil

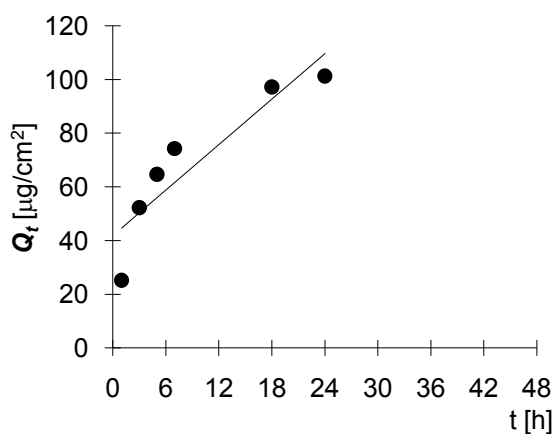
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,163	1	0,163	25,2	25,2
3	0,327	1	0,337	52,2	52,2
5	0,386	1	0,417	64,7	64,7
7	0,423	1	0,479	74,3	74,3
18	0,543	1	0,627	97,2	97,2
24	0,534	0	0,653	101,2	101,2

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	25,2	44,7
3	52,2	50,3
5	64,7	56,0
7	74,3	61,6
18	97,2	92,7
24	101,2	109,6

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 2,822149$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 41,85677$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,90891$	



## Protokol P1-8

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,6$

Jazyk: npCS4

Donor: CP+sil

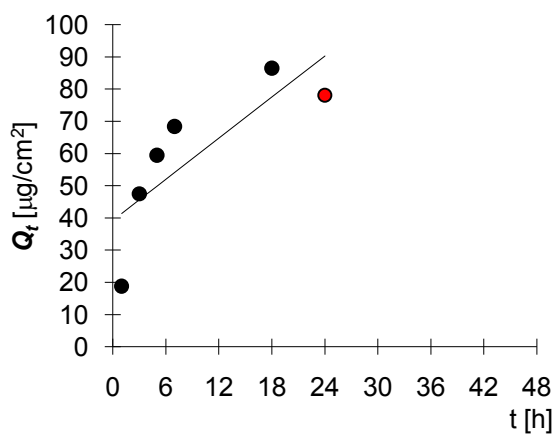
Měření: P1

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,107	1	0,107	18,8	18,8
3	0,264	1	0,270	47,5	47,5
5	0,317	1	0,338	59,4	59,4
7	0,350	1	0,389	68,4	68,4
18	0,432	1	0,491	86,5	86,5
24	0,360	0	0,444	78,1	78,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	18,8	41,3
3	47,5	45,6
5	59,4	49,9
7	68,4	54,1
18	86,5	77,5
24	78,1	90,3

Parametry regrese		
Počet bodů	n = 6	
Flux	J = 2,127838	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	q = 39,21895	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	r = 0,805614	



## Protokol P2-1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,9$

Jazyk: npFS5

Donor: FP+sil

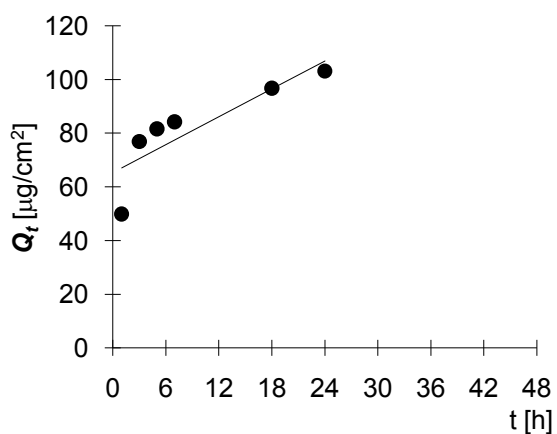
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,279	1	0,279	49,9	49,9
3	0,414	1	0,430	76,9	76,9
5	0,417	1	0,456	81,6	81,6
7	0,409	1	0,471	84,2	84,2
18	0,455	1	0,540	96,7	96,7
24	0,466	0	0,576	103,1	103,1

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	49,9	67,1
3	76,9	70,5
5	81,6	74,0
7	84,2	77,5
18	96,7	96,5
24	103,1	106,9

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 1,732544$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 65,33652$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,858449$	



## Protokol P2-2

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,4$

Jazyk: npFS6

Donor: FP+sil

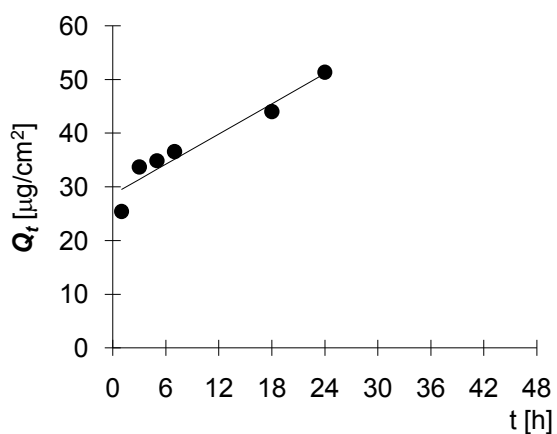
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,165	1	0,165	25,4	25,4
3	0,208	1	0,219	33,7	33,7
5	0,202	1	0,226	34,9	34,9
7	0,200	1	0,237	36,6	36,6
18	0,236	1	0,286	44,0	44,0
24	0,268	0	0,333	51,3	51,3

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	25,4	29,5
3	33,7	31,4
5	34,9	33,3
7	36,6	35,1
18	44,0	45,5
24	51,3	51,1

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 0,939094$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 28,57515$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,963331$	



## Protokol P2-3

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,8$

Jazyk: npFS7

Donor: FP+sil

Měření: P2

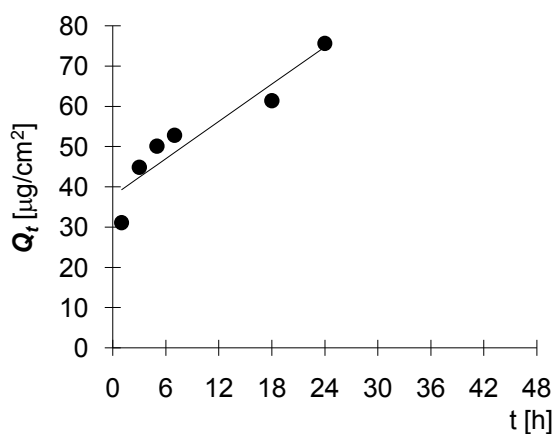
Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,175	1	0,175	31,1	31,1
3	0,242	1	0,252	44,9	44,9
5	0,258	1	0,281	50,1	50,1
7	0,259	1	0,297	52,8	52,8
18	0,293	1	0,345	61,4	61,4
24	0,356	0	0,425	75,6	75,6

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	31,1	39,3
3	44,9	42,4
5	50,1	45,5
7	52,8	48,5
18	61,4	65,5
24	75,6	74,7

### Parametry regrese

Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 1,541607$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 37,74335$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,940859$	





## Protokol P2-4

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,1$

Jazyk: npFS8

Donor: FP+sil

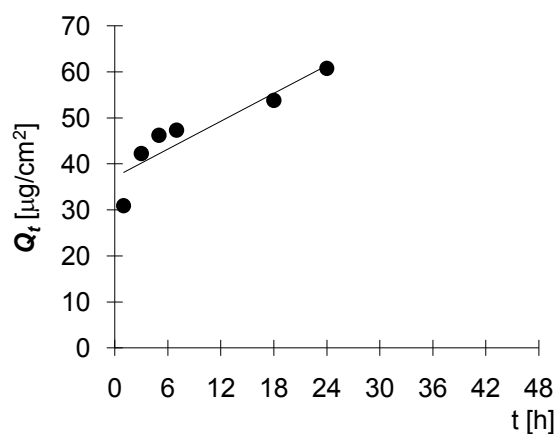
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,192	1	0,192	30,9	30,9
3	0,251	1	0,262	42,3	42,3
5	0,259	1	0,287	46,2	46,2
7	0,250	1	0,294	47,3	47,3
18	0,275	1	0,334	53,8	53,8
24	0,301	0	0,377	60,8	60,8

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	30,9	38,1
3	42,3	40,1
5	46,2	42,2
7	47,3	44,2
18	53,8	55,3
24	60,8	61,4

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 1,01061$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 37,10555$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,913993$	



## Protokol P2-5

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,8$

Jazyk: npCS5

Donor: CP+sil

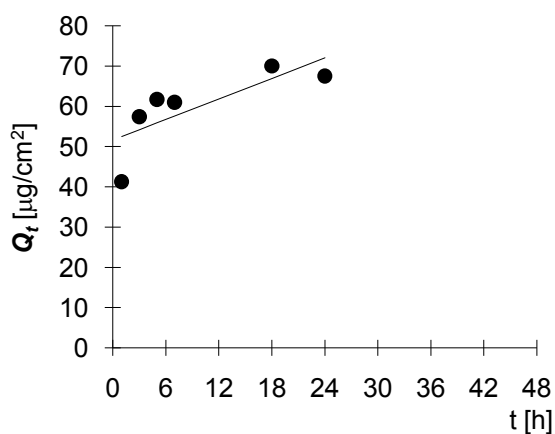
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,261	1	0,261	41,3	41,3
3	0,347	1	0,364	57,4	57,4
5	0,352	1	0,391	61,7	61,7
7	0,325	1	0,386	61,0	61,0
18	0,362	1	0,443	70,0	70,0
24	0,323	0	0,427	67,5	67,5

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	41,3	52,5
3	57,4	54,2
5	61,7	55,9
7	61,0	57,6
18	70,0	66,9
24	67,5	72,0

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 0,850075$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 51,62013$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,769127$	



## Protokol P2-6

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,5$

Jazyk: npCS6

Donor: CP+sil

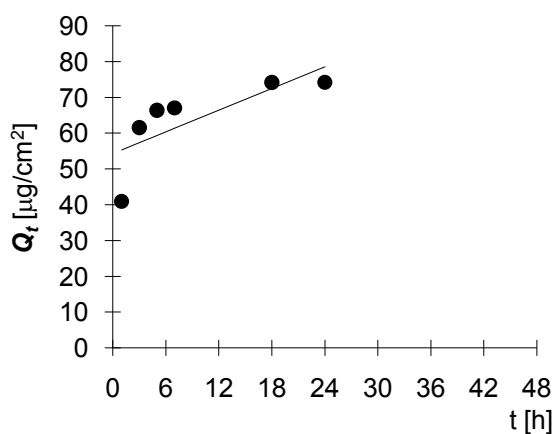
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,234	1	0,234	41,0	41,0
3	0,338	1	0,352	61,6	61,6
5	0,347	1	0,379	66,4	66,4
7	0,331	1	0,383	67,1	67,1
18	0,352	1	0,424	74,2	74,2
24	0,333	0	0,424	74,2	74,2

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	41,0	55,3
3	61,6	57,3
5	66,4	59,3
7	67,1	61,4
18	74,2	72,5
24	74,2	78,5

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 1,010158$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 54,28995$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,754114$	



## Protokol P2-7

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 15,5$

Jazyk: npCS7

Donor: CP+sil

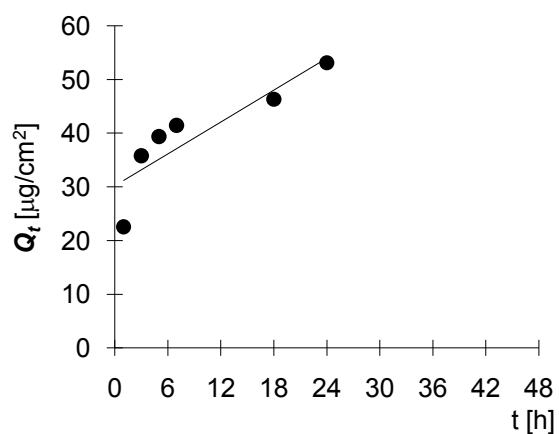
Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,145	1	0,145	22,5	22,5
3	0,222	1	0,231	35,8	35,8
5	0,230	1	0,254	39,4	39,4
7	0,229	1	0,267	41,4	41,4
18	0,246	1	0,299	46,3	46,3
24	0,274	0	0,343	53,1	53,1

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	22,5	31,2
3	35,8	33,2
5	39,4	35,1
7	41,4	37,1
18	46,3	48,0
24	53,1	54,0

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 0,989833$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 30,1939$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,87942$	



## Protokol P2-8

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,6$

Jazyk: npCS8

Donor: CP+sil

Měření: P2

Plocha: 1  $\text{cm}^2$

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,215	1	0,215	37,9	37,9
3	0,345	1	0,357	62,9	62,9
5	0,347	1	0,379	66,7	66,7
7	0,345	1	0,397	69,8	69,8
18	0,392	1	0,463	81,4	81,4
24	0,438	0	0,531	93,5	93,5

$t$	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	37,9	52,9
3	62,9	56,5
5	66,7	60,2
7	69,8	63,8
18	81,4	83,9
24	93,5	94,9

Parametry regrese		
Počet bodů	$n = 6$	
Flux	$J = 1,826418$	<input type="checkbox"/>
Abs. člen	$q = 51,05888$	<input type="checkbox"/>
Korelační koef.	$r = 0,894727$	

